

REPLICACION DEL PLASMIDO DE AMPLIO ESPECTRO DE HUESPED PLS1



* 5 3 0 9 5 7 8 2 9 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Memoria para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas
que presenta la Licenciada
Gloria del Solar Dongil

Universidad Complutense de Madrid,
Julio de 1991.

El autor:

Gloria del Solar

Vº.Bº., el director del trabajo:

Manuel Espinosa Padrón,
Profesor de Investigación,
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)



ARCHIVO

MANUEL ESPINOSA PADRON, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA que,

el presente trabajo, realizado por GLORIA DEL SOLAR DONGIL para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas y titulado "REPLICACION DEL PLASMIDO DE AMPLIO ESPECTRO DE HUESPED pLS1", ha sido realizado bajo su dirección en el Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C.

Y para que conste, se extiende el presente certificado en Madrid, a seis de Septiembre de mil novecientos noventa y uno.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Espinosa Padron', written over a horizontal line.

a Raquel y a Julio

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas, en el laboratorio de Manuel Espinosa, quien además de jefe y amigo es el otro culpable directo de la realización de esta Tesis.

Agradezco al Dr. Julian Perera el haber aceptado, sin rechistar, ser ponente de esta Tesis.

Mi más profundo, sincero y eterno agradecimiento a Maite Alda, Pedro Valiente y Remedios Galán, por su ayuda técnica, moral y nutricional.

Asimismo doy las gracias: A Belén Peral, por la construcción del plásmido pLS5*cop11* y por el estímulo que significaba su apremiante pregunta "¿y qué has averiguado hoy?", formulada casi a diario. A Theodora Choli, por haber secuenciado RepA. A Ramón Díaz, que me inició en el "mundillo" de la replicación *in vitro*. A Dusko Ehrlich, por haberme acogido en su laboratorio para aprender la preparación de las monocadenas. A Aurelio Hurtado, el excelente dibujante de esta Casa, capaz de convertir un gel mediocre en una obra de arte (sin retocar mucho las bandas, ¡claro!). A los miembros del Equipo Técnico del CIB, por el mantenimiento de los aparatos y el arreglo de los que se empeñaban en dejar de funcionar, a veces a horas intempestivas de la madrugada. A mis compañeros, por el tiempo "gastado" en fructíferas discusiones. A Carlota, que puso los puntos sobre las íes, y también el resto de las letras sobre los folios que le iba introduciendo.

Finalmente, quiero hacer una mención especial a Pablo por su ayuda, cuidados y desvelos durante todos estos años. Sin pretenderlo, él ha logrado ser, sin duda, el abogado más experto en técnicas de "ingeniería genética".

INDICE

INTRODUCCION.	1
- Modelos de replicación.	2
- Control de la replicación.	5
- El plásmido pMV158.	15
- Objetivo de la Tesis.	18
 MATERIALES.	 21
1. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS.	21
2. MEDIOS DE CULTIVO.	24
2.1. Medio de cultivo de <i>S.pneumoniae</i> .	24
2.2. Medios de cultivo de <i>B.subtilis</i> .	25
2.3. Medios de cultivo de <i>E.coli</i> .	27
3. TAMPONES Y SOLUCIONES.	28
4. ENZIMAS Y OTRAS PROTEINAS.	29
5. MATERIAL FOTOGRAFICO Y DE AUTORRADIOGRAFIA.	29
6. OTROS PRODUCTOS.	30
 METODOS.	 31
1. CONSERVACION DE LAS ESTIRPES.	31
2. CONDICIONES DE CULTIVO.	31
3. PUESTA EN COMPETENCIA Y TRANSFORMACION DE CELULAS BACTERIANAS.	32
3.1. <i>S.pneumoniae</i> .	32
3.2. <i>B.subtilis</i> .	32
3.3. <i>E.coli</i> .	34
4. DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS PLASMIDICO.	34
4.1. Determinaciones densitométricas.	34
4.2. Marcaje de DNA total <i>in vivo</i> .	35

5. TESTS DE ESTABILIDAD.	37
6. TESTS DE INCOMPATIBILIDAD.	38
7. PREPARACIONES DE DNA.	39
7.1. Extractos crudos celulares.	39
7.2. Minipreparaciones plasmídicas.	40
7.3. Preparación de plásmidos puros.	40
7.4. Valoración del DNA.	42
8. FENOLIZACION, PRECIPITACION Y DIALISIS DEL DNA.	42
9. MANIPULACION ENZIMATICA DEL DNA.	43
9.1. Digestión con endonucleasas de restricción.	43
9.2. Eliminación de extensiones protuberantes.	44
9.3. Relleno de extremos 3' recesivos mediante Pol IK.	44
9.4. Digestión con nucleasa BAL31.	45
9.5. Ligación de fragmentos de DNA.	45
9.6. Detección de sitios sensibles a nucleasa S1 en DNA superenrollado.	46
10. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS.	46
10.1. Electroforesis en geles de agarosa.	46
10.2. Electroforesis en geles de PAA (PAGE).	47
10.3. Electroforesis en geles de secuenciación.	47
10.4. Electroforesis en geles para la separación de cadenas.	48
11. EXTRACCION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES.	49
11.1. Utilización de membranas de DEAE-celulosa.	49
11.2. Utilización de "GeneClean".	49
11.3. Elución a partir de PAA.	50
12. MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA.	50
12.1. Marcaje en 5' con polinucleótido quinasa.	50
12.2. Marcaje en 3' con Pol IK.	51
12.3. Marcaje de DNA al azar por el método de extensión de cebadores.	51
13. DENSITOMETRIA.	52
14. SECUENCIACION DE DNA POR EL METODO DE DEGRADACION QUIMICA.	52
15. DETECCION DE FORMAS PLASMIDICAS MONOCATENARIAS.	54
16. REPLICACION <i>IN VITRO</i> DE DNA DE PLASMIDOS.	57
17. FLUOROGRAFIA.	61
17.1. Fluorografía de geles de agarosa.	61
17.2. Fluorografía de geles de PAA.	61

18. DETERMINACION DE LOS PUNTOS DE INICIACION DE mRNAs MEDIANTE MAPEO CON NUCLEASA S1.	62
19. SINTESIS DE PROTEINAS PLASMIDICAS EN MINICELULAS DE <i>B.SUBTILIS</i> .	64
20. HIPEREXPRESION DE GENES BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR $\phi 10$ DEL FAGO T7.	65
21. CROMATOGRAFIA DE PROTEINAS.	69
21.1. Filtración en gel.	69
21.2. Cromatografía de intercambio iónico.	70
21.3. Cromatografía de afinidad.	70
22. DETERMINACION DE LA CONFIGURACION NATIVA DE PROTEINAS.	71
22.1. Centrifugación analítica en gradiente de glicerol.	71
22.2. Filtración en gel.	71
23. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.	72
23.1. Preparación de las muestras para electroforesis.	72
23.2. Geles de PAA/SDS.	72
23.3. Geles de PAA/SDS/urea.	73
23.4. Geles de PAA/SDS con DNA en la matriz.	73
24. VALORACION DE PROTEINAS.	74
24.1. Utilización del reactivo BCA.	74
24.2. Densitometría de geles teñidos con CBB.	74
24.3. Determinación de la concentración molar.	74
25. DETERMINACION DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE RepA.	75
26. DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL DE RepB.	75
27. ANALISIS DE CONTACTOS DNA-PROTEINA.	75
27.1. Protección frente a la digestión con DNasa I.	75
27.2. Protección frente a la rotura por radical hidroxilo.	76
28. ENSAYOS DE TRANSCRIPCION <i>IN VITRO</i> .	77
29. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.	78
30. ANALISIS ASISTIDO CON ORDENADOR.	79

RESULTADOS.	81
1. ESPECTRO DE HUESPED Y ESTABILIDAD DEL PLASMIDO pMV158 Y SUS DERIVADOS.	81
2. REPLICACION EN EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS.	85
- Optimización del sistema.	85
- Características del sistema en extractos que no contienen plásmido endógeno.	90
- Características del sistema en extractos con plásmido endógeno.	92
- Análisis de los productos de reacción.	94
3. ORIGEN Y DIRECCION DE REPLICACION DE LA CADENA LIDER.	98
- Localización del sitio de iniciación, y determinación de la dirección de replicación del DNA de pLS1 en el sistema <i>in vitro</i> .	98
- Intermediarios de cadena sencilla generados durante la replicación <i>in vivo</i> del DNA de pLS1.	101
- Mapeo de posibles estructuras secundarias en el DNA de pLS1.	107
- Análisis de delección del origen funcional.	113
4. EL ORIGEN DE LA CADENA RETRASADA.	117
- Características generales del <i>ori</i> (-) de pLS1.	117
- Localización del <i>ori</i> (-) de pLS1.	120
- Características diferenciales de pLS4.	120
- Características de la secuencia de nucleótidos en la región delecionada en pLS4.	125
5. CARACTERIZACION DE LA FUNCION INICIADORA DE LA REPLICACION.	129
- Determinación del sitio de iniciación del mRNA <i>repAB</i> .	131
- Hiperexpresión de <i>repB</i> .	134
- Purificación de RepB.	141
- Determinación del extremo N-terminal de RepB pura e identificación del codón de iniciación de <i>repB</i> .	148
- Actividad enzimática de RepB.	150
6. REGULACION TRANSCRIPCIONAL DE <i>repB</i> : LA PROTEINA RepA.	153
- Síntesis e identificación de RepA en minicélulas de <i>B.subtilis</i> y en el sistema de expresión de <i>E.coli</i> .	155
- Purificación de RepA.	159
- Secuencia de aminoácidos de RepA.	163
- Peso molecular de la proteína RepA nativa.	164
- Características de RepA.	165
- Localización de la diana de RepA.	172
- La proteína RepA inhibe su propio promotor <i>in vitro</i> .	177
- RepA reprime su propio promotor <i>in vivo</i> .	183
- Localización del operador de RepA.	185
- Actividad <i>in vivo</i> de RepA en su entorno fisiológico.	194

7. CONTROL PRIMARIO DE LA REPLICACION: EL PAPEL DEL RNA II.	202
- Caracterización del RNA II mediante ensayos de transcripción <i>in vitro</i> .	202
- Elementos del replicón pLS1 que expresan incompatibilidad.	206
 DISCUSION.	 225
 RESUMEN Y CONCLUSIONES.	 263
 BIBLIOGRAFIA.	 267

ABREVIATURAS

Ap	ampicilina.
Ap ^r	resistentes o resistencia a Ap.
ATP	adenosina 5'-trifosfato.
β ME	β -mercaptoetanol.
BSA	seroalbúmina bovina.
cAMP	adenosina-5'-3'-monofosfato (AMP cíclico).
CBB	azul brillante de Coomassie.
ccc	circular covalentemente cerrado.
Cm	cloramfenicol.
Cm ^r	resistentes o resistencia a Cm.
cols	colaboradores.
cpm	cuentas por minuto.
CTP	citidina 5'-trifosfato.
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato.
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato.
ddTTP	2',3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato.
DEAE	dietilaminoetil.
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato.
DMS	dimetilsulfato.
DMSO	dimetilsulfóxido.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DNasa	desoxirribonucleasa.
dNTP	desoxinucleósido 5'-trifosfato.
DO	densidad óptica.
dsDNA	DNA de doble cadena.
DTT	ditiotreitól.
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato.
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico.
EG	etilenglicol.
EGTA	ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetil éter) N-N'-tetraacético.
EtBr	bromuro de etidio.
GTP	guanosina 5'-trifosfato.
[³ H]-dTTP	(metil- ³ H) desoxitimidina 5'-trifosfato.
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperacín-N'-2-etanosulfónico.
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
kb	10 ³ bases o pares de bases.
kDa	kilodalton(s).
MOPS	ácido morfolinopropanosulfónico.
MPa	megapascal(es).
M _r	movilidad relativa.
mRNA	RNA mensajero.
NAD	nicotinamida-adenina dinucleótido.
Na-DOC	desoxicolato sódico.
Nov	novobiocina.
nt(s)	nucleótido(s).
NTP	nucleósido trifosfato.
OC	circular abierto.
orf	frente de lectura abierto.
ORF	posible polipéptido codificado por una orf.
PAA	poliacrilamida.
PAGE	electroforesis en gel de PAA.
pb	pares de bases.

pd(N) ₆	mezcla de hexadesoxinucleótidos.
PEG	polietilenglicol.
PIPES	ácido 1,4-piperazin dietanosulfónico.
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
Pol IK	fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de <i>E.coli</i> .
POPOP	2,2'- <i>p</i> -fenilen-bis(5-feniloxazol).
PPO	2,5-difeniloxazol.
PSA	persulfato amónico.
RF	forma replicativa.
Rif	rifampicina.
RNA	ácido ribonucleico.
RNasa	ribonucleasa.
rpm	revoluciones por minuto.
S.D.	sitio de unión a los ribosomas (Shine-Dalgarno).
[³⁵ S]-dATP	desoxiadenosina 5'-α-[³⁵ S]-tiotriofsfato
SDS	dodecil sulfato sódico.
ssDNA	DNA de cadena sencilla.
Tc	tetraciclina.
Tc'	resistentes o resistencia a Tc.
TCA	ácido tricloroacético.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina.
Tris	trihidroximetil-amino-metano.
tRNA	RNA de transferencia.
ts	termosensible.
u	unidades.
u.f.c.	unidades formadoras de colonia.
UTP	uridina 5'-trifosfato.

INTRODUCCION

En los cerca de treinta y cinco años transcurridos desde el descubrimiento de los plásmidos bacterianos, estos elementos extracromosómicos han contribuido notablemente al desarrollo actual de la Genética, la Biología Molecular y la Biotecnología. Las primeras investigaciones llevadas a cabo en biología plasmídica tuvieron como objetivo estudiar los mecanismos de fertilidad conjugacional y resistencia a antibióticos en bacterias entéricas. Los conocimientos aportados por estas investigaciones, junto con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y de la transformación bacteriana, propiciaron el uso de plásmidos como vectores de clonaje. Aún en la actualidad, los plásmidos parecen representar para muchos biotecnólogos poco más que vectores para el clonaje y expresión de genes de interés, mientras que para algunos investigadores en Biomedicina sólo parecen ser molestos elementos de diseminación de resistencias a antibióticos. En contraste con esta visión minimalista, sólo un conocimiento profundo de la biología de los plásmidos ha permitido (y permitirá en el futuro) solucionar los problemas surgidos en otras áreas de investigación. Así, cuando se emplean plásmidos recombinantes en procesos industriales, la capacidad para regular el número de copias de un replicón (manteniéndolo inicialmente bajo y amplificándolo después) puede incrementar su estabilidad durante la fase de crecimiento inicial del cultivo y ayudar a optimizar el rendimiento del producto durante la fase de expresión. Desde el punto de vista médico, el conocimiento de la replicación plasmídica puede tener una importante aplicación en los problemas de antibiótico-resistencias mediadas por plásmidos y su transmisión entre bacterias patógenas. Como en un circuito de autopotenciación, los problemas surgidos en diversas áreas de la Biología aplicada han contribuido, a su vez, a estimular la investigación básica sobre los plásmidos. Tal investigación ha sido fundamental para el conocimiento de procesos biológicos claves, como la conjugación, el control de la expresión génica, la topología del DNA, la transposición, la recombinación, la partición de información genética en el momento de la división celular, y un largo etcétera que incluye, por supuesto, la replicación plasmídica y su control, protagonistas principales a lo largo de este trabajo. En este sentido, los plásmidos son más adecuados que los cromosomas para el estudio de la replicación y su control, ya que al ser dispensables para el huésped permiten mucha más libertad genética y bioquímica al investigador. Como la Naturaleza parece ofrecer un número limitado de soluciones a un determinado problema, algunos de los mecanismos encontrados en los plásmidos

pueden tener un significado funcional mucho más amplio. Quizás el descubrimiento más general efectuado durante los estudios sobre el control de la replicación plasmídica es que el RNA puede funcionar como un represor que actúa *en trans*. Este mecanismo no sólo se ha encontrado posteriormente en muchos otros circuitos reguladores naturales, sino que ha proporcionado también un medio para introducir circuitos sintéticos de control en microbios, plantas y animales (Inouye y Dudock, 1987).

Por razones prácticas (no quiero comenzar aburriendo al sufrido lector desde tan temprano), este capítulo va a estar centrado, exclusivamente, en la replicación plasmídica y su control. Otros temas más o menos relacionados con éste, y que han ido surgiendo durante el desarrollo de esta Tesis, se tratarán de forma puntual en el correspondiente capítulo de Resultados o Discusión. Además, no voy a describir con todo detalle los sistemas de replicación bien caracterizados, sino que me referiré sólo a aquéllos que más recuerdan al de pLS1, ya sea en la organización de su circuito de control (plásmido R1 de *Escherichia coli*), o por compartir el mismo mecanismo de replicación (plásmido pT181 de *Staphylococcus aureus*).

Modelos de replicación.

En la replicación del DNA plasmídico, como en la de cualquier otro DNA, la iniciación es una etapa clave y específica para cada replicón. Efectivamente, es en la iniciación donde se consigue generar un grupo 3'-OH libre sobre el que las DNA polimerasas (de otra forma incapaces de iniciar la replicación) incorporarán los nucleótidos complementarios al molde. Las estrategias adoptadas para conseguir este objetivo son muy diversas (revisado en Salas, 1988), pero en los plásmidos mejor conocidos de bacterias gram-negativas implica la síntesis de un RNA cebador o "primer". Así, la replicación (*in vivo* e *in vitro*) de los plásmidos tipo ColE1 se inicia a partir de un RNA "primer" cuya síntesis es sensible a Rif (Clewelly y cols, 1972; Sakakibara y Tomizawa, 1974). Como indica esta sensibilidad, es la RNA polimerasa de *E.coli* el enzima encargado de sintetizar un transcrito precursor del "primer", que es procesado por la RNasa H para dar lugar al RNA "primer" (Itoh y Tomizawa, 1980). La iniciación de la replicación de ColE1 es uno de los ejemplos mejor y desde más antiguo conocidos. Otros plásmidos de bacterias gram-negativas presentan un mecanismo de iniciación mucho más complejo, lo que ha dificultado su estudio y elucidación. En ellos es esencial la acción de una proteína iniciadora específica, Rep, codificada por el mismo replicón. La actuación de estas proteínas Rep en la iniciación responde a un mecanismo común: reconocen

secuencias específicas en los orígenes de replicación, y forman con ellos complejos nucleoproteicos similares al descrito para DnaA en *oriC* (revisado en Giraldo, 1991). En el caso del plásmido R1 (que nos interesa especialmente porque su mecanismo de control, aunque no el de replicación, tiene ciertas analogías con el que hemos encontrado para pLS1), la iniciación de la replicación implica, en primer término, la unión específica de la respectiva proteína Rep (RepA) a una región del *oriR* (Masai y Arai, 1987; Giraldo, 1991). A continuación, y al parecer dirigida por RepA, se produce la entrada de la proteína DnaA en la caja dnaA adyacente al sitio de unión de RepA (Masai y Arai, 1987). El DNA de *oriR* sufre una desnaturalización parcial en una región que presenta tres repeticiones de 9 pb con alto contenido en A+T (Bramhill y Kornberg, 1988). La helicasa DnaB se sitúa en el complejo abierto y extiende unidireccionalmente la horquilla de replicación. Finalmente comienza la síntesis de la hebra líder, promovida por la primasa DnaG, que sintetiza un RNA cebador (Masai y Arai, 1989).

Todos los plásmidos mejor estudiados de bacterias gram-negativas (incluyendo ColE1 y R1) replican mediante un mecanismo tipo Θ , así denominado por la morfología que exhiben los intermediarios replicativos. Durante largo tiempo, éste fue el único mecanismo de replicación plasmídica conocido. A ello se debe, quizás, que los resultados de los primeros análisis al microscopio electrónico de intermediarios replicativos de plásmidos de bacterias gram-positivas (pT181, pE194 y pUB110, todos ellos originarios de *S.aureus*) fueran interpretados como un ejemplo más de este tipo de replicación (Scheer-Abramowitz y cols, 1981). Sin embargo, en experimentos posteriores realizados con pT181 comenzaron a acumularse una serie de evidencias circunstanciales que llevaron a R.P. Novick y a sus colaboradores a proponer un mecanismo distinto para la replicación de este plásmido (Khan y cols, 1982; Koepsel y cols, 1985a). Estos autores sugirieron que pT181 replicaría mediante un mecanismo de círculo rodante asimétrico, similar al descrito para la multiplicación de la forma replicativa (RF \rightarrow RF) del DNA de los colifagos de cadena sencilla (M13, fd, ϕ X174, etc.; Kornberg, 1980). La replicación mediante círculo rodante implica una etapa de iniciación independiente de la síntesis de un RNA "primer", ya que el grupo 3'-OH libre requerido por las DNA polimerasas es generado por la rotura específica de una de las hebras del DNA. En líneas generales, el modelo propuesto (y en gran medida confirmado) para la replicación de pT181 se basa en el mecanismo descrito para colifagos de cadena sencilla, y es el siguiente (Novick, 1989):

a) La proteína RepC codificada por pT181 se une al origen de replicación de la cadena líder [*ori*(+)], introduciendo un corte monocatenario específico en la hebra codificante [cadena (+)] del plásmido, entre los nucleótidos 71 y 70 (T/A). Esta rotura genera un extremo 3'-OH libre y un extremo 5'-P unido covalentemente a RepC (Koepsel

y cols, 1985a).

b) La síntesis de la cadena líder se inicia por extensión del extremo 3'-OH, en tanto que la cadena (+) parental unida a RepC va siendo desplazada. Esta etapa debe requerir, además, una serie de proteínas del huésped, análogas a las usadas en la replicación RF \rightarrow RF del DNA de los colifagos de cadena sencilla (SSB, holoenzima de la DNA polimerasa III, helicasa). De momento parece clara la intervención de la DNA polimerasa III, a juzgar por la sensibilidad que muestra la replicación *in vivo* de pT181 frente al inhibidor 5-hidroxifenil azouracilo (Majumder y Novick, 1988).

c) El desplazamiento de la cadena parental y la síntesis de la cadena líder continúan hasta que la horquilla de replicación alcanza el origen reconstituido. Se produce entonces la terminación de la cadena líder mediante una reacción de intercambio de cadenas (presumiblemente catalizada por la proteína RepC unida) en el sitio donde tuvo lugar la rotura iniciadora de la replicación (Iordanescu y Projan, 1988). En esta reacción se produce, al mismo tiempo, la circularización y liberación de la cadena (+) desplazada. En este punto, no siempre se habrá iniciado la síntesis de la hebra retrasada sobre el molde de la cadena desplazada, por lo que ésta aparece (al menos en gran medida) como

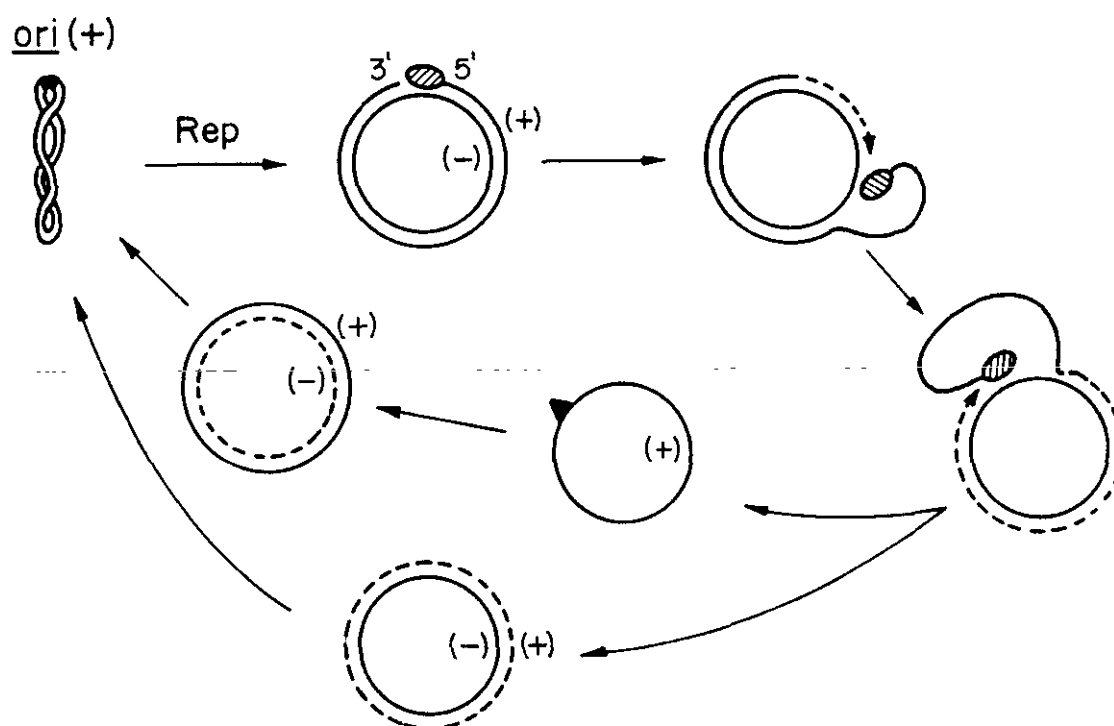


Figura 1. Modelo de replicación plasmídica mediante círculo rodante asimétrico. El proceso se inicia cuando la proteína Rep (●) introduce una rotura específica de la cadena (+) en la región del origen, generando un extremo 3'-OH libre y quedando covalentemente unida al extremo 5'-P. La síntesis de la cadena líder (-) tiene lugar por extensión en 3', mientras la hebra (+) parental va siendo desplazada. Cuando la horquilla de replicación alcanza el *ori*(+) regenerado, termina la síntesis de la cadena líder y se produce, al mismo tiempo, la circularización y liberación de la hebra desplazada. Esta presentaría una señal (▲) reconocida por las proteínas del huésped para la iniciación de la cadena retrasada, con cuya síntesis concluye la replicación semiconservativa del DNA del plásmido.

un DNA circular de banda simple. Los productos obtenidos, pues, hasta esta etapa de la replicación son: un DNA de doble banda con una cadena (-) parental y una (+) de nueva síntesis, y un DNA circular monocatenario que corresponde a la cadena parental (+).

d) Sobre el DNA monocatenario se reconoce una señal para la iniciación de la cadena retrasada. La síntesis de ésta da lugar a una segunda molécula de DNA bicatenario formada, en esta ocasión, por una cadena (+) parental y una (-) de nueva síntesis. Con esta etapa, similar a la que tiene lugar a partir del *ori*(-) de los colifagos de cadena sencilla, se completa la replicación del plásmido.

Un esquema de lo que podría ser la replicación de un plásmido mediante un mecanismo de círculo rodante asimétrico se presenta en la Figura 1. Este esquema general está basado en el modelo de Novick (1989), y en los datos del proceso replicativo de los colifagos de cadena sencilla (Kornberg, 1980).

Este modelo de círculo rodante para la replicación plasmídica tiene bien ganado el adjetivo de asimétrico, ya que existe un fuerte desacoplamiento entre la síntesis de las cadenas líder y retrasada. Como acabamos de ver, este desacoplamiento da lugar a la formación de intermediarios replicativos monocatenarios. No es de extrañar, por tanto, que la acumulación *in vivo* de ssDNA plasmídico específico de hebra haya sido considerada, desde el lanzamiento del modelo de círculo rodante para pT181, como una indicación de la replicación de un plásmido a través de este mecanismo (te Riele y cols, 1986a). Con este argumento se ha propuesto que la replicación de la mayoría, si no todos, de los pequeños plásmidos multicopia de *S.aureus* se llevaría a cabo mediante un mecanismo de círculo rodante asimétrico (Novick, 1989).

Control de la replicación.

Una consideración general e importante acerca de la replicación plasmídica es que ésta debe estar sometida a un fuerte control, ya que el número de copias es una característica fija de un determinado plásmido en un determinado huésped, bajo condiciones constantes. Parece estar claro que, en cualquier proceso replicativo, el control se ejerce a nivel de la iniciación y no durante las etapas posteriores de elongación y terminación (Pritchard, 1974). Esto evita un gasto energético inútil a la célula y es particularmente obvio en el caso de los plásmidos, en cuya replicación se invierten, como más, de 1 a 3 min (aun cuando se trate de una molécula de gran tamaño; Nordström y

cols, 1984). Existe, además, otra razón lógica para que el control de la replicación se lleve a cabo durante la etapa de iniciación: dicha etapa es (como vimos antes) la que confiere la especificidad, por lo que su regulación es capaz de asegurar el control autógeno del replicón. Así, la replicación de un plásmido (y por tanto su número de copias) está controlada por un sistema que él mismo codifica, y que determina la tasa de iniciación de la replicación, utilizando la inhibición como principal estrategia (Novick, 1987).

Cuantitativamente, la regulación de la replicación es de máxima importancia para determinar la incompatibilidad plasmídica, la cual se define como la incapacidad de dos plásmidos corresidentes para ser heredados de forma estable en ausencia de selección externa (Novick, 1987). En términos generales, la incompatibilidad se produce cuando dos plásmidos comparten uno o más elementos de los sistemas de replicación o partición. Sin embargo, la incompatibilidad debida a un sistema de partición común es, normalmente, menos fuerte que la determinada por un elemento de control replicativo compartido. La pérdida plasmídica debida a incompatibilidad es, a menudo, una consecuencia de la interferencia con la capacidad del plásmido para corregir fluctuaciones estocásticas en su número de copias (Novick, 1987). La incompatibilidad plasmídica debe ser contemplada, pues, como una consecuencia automática de la actividad normal de ciertas funciones de replicación y mantenimiento, y no como la manifestación fenotípica de genes "*inc*" (de incompatibilidad).

Todos los sistemas de regulación plasmídica conocidos hasta la fecha emplean para su funcionamiento, o bien una estrategia inhibidor-diana, o bien una estrategia de unión a iterones. En los sistemas inhibidor-diana, el plásmido codifica un inhibidor difusible que actúa uniéndose a una diana específica del propio plásmido; esta unión bloquea la replicación, ya sea directamente o impidiendo la síntesis de un producto requerido. En los sistemas de unión a iterones, el plásmido codifica una proteína iniciadora difusible, y contiene una o varias series de oligonucleótidos directamente repetidos (iterones) capaces de unir la proteína. El mecanismo regulador involucra tanto autorrepresión de la proteína iniciadora (Chattoraj y cols, 1985; Shafferman y cols, 1982) como unión de la proteína a los iterones. Esta unión puede tener un efecto inhibidor directo sobre la replicación, puede regular mediante titulación la concentración de iniciador, o ambas cosas a la vez (Chattoraj y cols, 1985; Shafferman y cols, 1982; Novick, 1987). Aunque la regulación plasmídica mediante la estrategia de unión a iterones es ampliamente empleada en la Naturaleza y ha sido estudiada en plásmidos como F, P1, pSC101 y R6K, los ejemplos que más nos interesan utilizan, todos ellos, un sistema regulador de tipo inhibidor-diana.

Atendiendo a su modo de acción, un regulador negativo puede inhibir directamente un determinado proceso (regulación directa), o puede inhibir la síntesis de un producto requerido para tal proceso (regulación indirecta). Entre los plásmidos que emplean un sistema inhibidor-diana existen ejemplos de uno y otro tipo de regulación. Los esquemas generales de regulación de los tres plásmidos inhibidor-diana más estudiados (ColE1, R1 y pT181) se muestran en la Figura 2. ColE1, cuyo inhibidor bloquea la síntesis del "primer" de replicación, es el ejemplo más claro de regulación directa. Por su parte, el plásmido pT181, cuyo inhibidor bloquea la síntesis de la proteína iniciadora de la replicación (RepC) activa en *trans* (Kumar y Novick, 1985), ejemplifica la regulación indirecta. En el caso de R1, el inhibidor también bloquea la síntesis de una proteína de replicación (RepA). Sin embargo, esta proteína es activa en *cis* (Masai y cols, 1983), por lo que el bloqueo de su síntesis afecta sólo a la molécula plasmídica inhibida. Esto significa que R1 utiliza, a todos los efectos, una regulación directa. Pese a lo que pudiera parecer, la distinción entre regulación directa e indirecta no responde a un simple afán de crear agrupaciones inútiles desde el punto de vista práctico, sino que tiene importantes consecuencias en lo que respecta a la incompatibilidad plasmídica. Así, para los plásmidos directamente regulados (ColE1 y R1), el principal determinante de incompatibilidad es la región que codifica el inhibidor, en tanto que el origen de

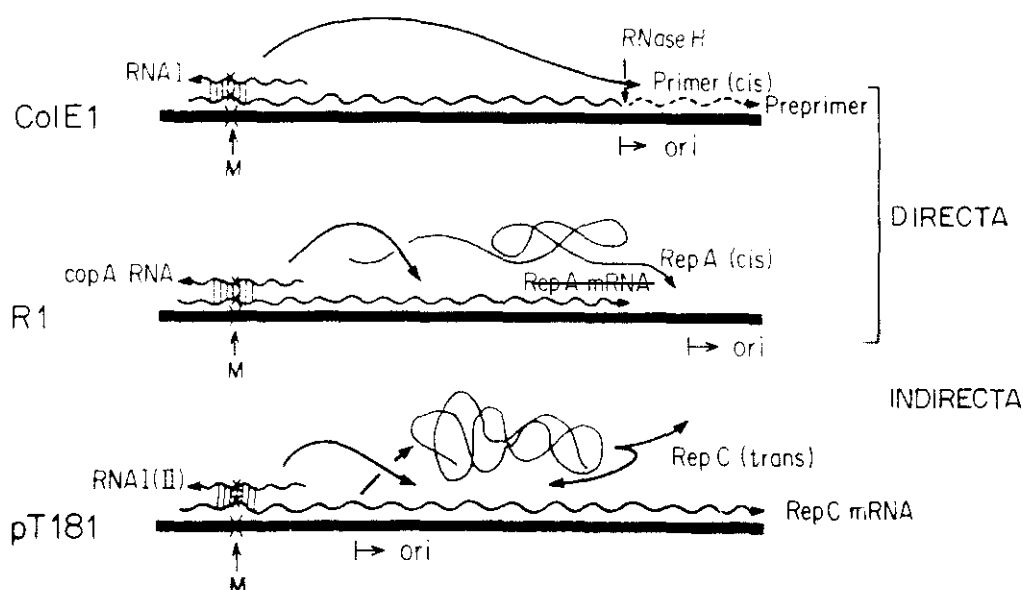


Figura 2. Regulación directa frente a indirecta en los plásmidos con sistema inhibidor-diana. Cada uno de los tres plásmidos prototipo presenta un transcrito de gran tamaño (la diana de la inhibición) y un pequeño *ctRNA* (el inhibidor). El producto de la etapa regulada (el "primer" de ColE1, y las proteínas iniciadoras RepA de R1 y RepC de pT181) es específico en *cis* para los dos plásmidos de *E.coli*, pero activo en *trans* para pT181. "M" representa mutaciones en la región de solapamiento de inhibidor y diana; *ori* indica la localización del origen de replicación y la dirección de ésta. Figura tomada de Novick (1987).

replicación clonado no produce incompatibilidad (Novick, 1987). Para plásmidos regulados de forma indirecta (pT181), el origen de replicación constituye un segundo determinante de incompatibilidad (aparte del determinante primario que es, por supuesto, el inhibidor; Novick, 1987). Además, plásmidos directa e indirectamente regulados difieren marcadamente en los efectos que muchas mutaciones reguladoras causan sobre la incompatibilidad. Para plásmidos regulados de forma directa, estas mutaciones producen, por lo general, una asimetría en la regulación: uno de los plásmidos es más sensible al inhibidor del otro y, como consecuencia, resulta preferencialmente eliminado de la población heteroplasmídica en condiciones no selectivas (Tomizawa e Itoh, 1981). Por otro lado, si ambos inhibidores son menos activos en la diana contraria que en la suya propia, se produce un grado de independencia que puede conducir, en último caso, al aislamiento regulador completo de ambos plásmidos (Tomizawa e Itoh, 1981). Esto significa que los números de copias de uno y otro plásmido se corrigen independientemente, estableciéndose nuevas especificidades de incompatibilidad (los dos plásmidos pertenecerán a grupos de incompatibilidad distintos). Por el contrario, en replicones regulados indirectamente, mutaciones que afectan al inhibidor, a la diana, o a ambos, no producen generalmente asimetría reguladora entre dos plásmidos distinguibles (mutante y silvestre, o dos mutantes distintos; Novick y cols, 1985). La explicación a este hecho parece clara y predecible: aunque la diana correspondiente a uno de los plásmidos sea más sensible al inhibidor codificado por el otro, ninguno de los dos plásmidos va a encontrarse en desventaja, ya que el producto de la etapa regulada es una proteína activa en *trans*, capaz de iniciar la replicación sobre cualquiera de ellos. Con este mismo argumento se puede predecir que, en plásmidos regulados indirectamente, ningún cambio en la especificidad inhibidor-diana puede llegar a generar un nuevo grupo de incompatibilidad. Esta predicción ha sido confirmada por Projan y Novick (1986), quienes han mostrado que mutaciones en la región reguladora de pT181 que hacen que un plásmido sea completamente insensible al inhibidor del otro y viceversa, no eliminan la incompatibilidad de ambos plásmidos. De forma similar, un derivado de pT181 cuya región de control de copias ha sido reemplazada por la de un plásmido compatible muy relacionado (pC221), sigue siendo incompatible con pT181 aun cuando los dos sistemas de control de copias son totalmente independientes (Projan y Novick, 1986).

Los tres replicones con sistema inhibidor-diana escogidos como prototipos (ColE1, R1 y pT181), tienen en común que los dos componentes del sistema regulador son moléculas de RNA complementarias. Para los tres plásmidos, la diana de acción es un largo transcrito cuya función se requiere para la replicación. En ColE1, el transcrito diana es el precursor del "primer" para la replicación (Tomizawa y cols, 1981), mientras

que para R1 y pT181 es el mRNA para la proteína plasmídica iniciadora de la replicación (Light y Molin, 1982a; Kumar y Novick, 1985). En cuanto al inhibidor, los tres plásmidos utilizan pequeños RNAs (de 80 a 150 nts) que se sintetizan a partir de la región que codifica el extremo 5' del transcrito diana, en dirección opuesta a la síntesis de éste. Debido a estas características de los RNAs inhibidores, Kumar y Novick (1985) han propuesto para ellos el término de RNAs contratranscritos (ctRNAs), que usaremos en adelante. A continuación se detallan los modelos de regulación de los dos plásmidos que más se acercan a pLS1, ya sea en su control (R1), o en su mecanismo de replicación (pT181).

El control de la replicación del plásmido R1 se ejerce a nivel de la síntesis de la proteína iniciadora RepA de origen plasmídico, cuyos niveles determinan la tasa de iniciación del proceso replicativo (Light y Molin, 1982a). El gen *repA* puede expresarse a partir de dos promotores, P_{copB} y P_{repA} , situados, respectivamente, en posición más distal y más proximal al inicio de su secuencia codificante (Fig. 3). La transcripción desde P_{copB} incluye los genes *copB* y *repA* y dos *orfs* (3k y 7k, para posibles productos de 3 y 7 kDa); la transcripción a partir de P_{repA} incluye, por su parte, *repA* y ambas *orfs*. En la región de control de R1 existe, además, un tercer promotor (P_{copA}), desde el cual se transcribe el gen *copA* en dirección opuesta a la de transcripción desde P_{copB} y P_{repA} (Fig. 3). La síntesis de RepA está controlada negativamente por los productos de los genes *copA* y *copB*, que son, respectivamente, el ctRNA CopA y la proteína CopB. El gen *copB* se expresa constitutivamente (Light y Molin, 1982b) para dar lugar a la pequeña proteína CopB (11 kDa), que es un represor transcripcional del promotor P_{repA} (Riise y Molin, 1986). En condiciones normales, los niveles de CopB son suficientes para saturar su sitio de acción, de forma que la expresión de *repA* sólo tiene lugar a partir del promotor P_{copB} (Fig. 3). De aquí se desprende que *copB* es incapaz de corregir fluctuaciones que signifiquen un incremento en el número de copias de R1 y, en consonancia con esto, un aumento en la dosis de este gen no va a conducir a cambios en el número de copias plasmídico (Riise y cols, 1982). La actividad de P_{repA} parece estar reservada, únicamente, a situaciones de máxima emergencia en las que el número de copias de R1 caiga por debajo del normal (Light y Molin, 1982a). En estos casos, la caída de la represión por CopB permite una rápida autocorrección de los niveles de copias a través de un incremento en la transcripción de *repA* (Light y Molin, 1982a).

Queda, pues, claro que el principal controlador de la replicación de R1 es el producto del gen *copA*, que ha sido identificado como un ctRNA de 93 nts de longitud (RNA-CopA), complementario a una región del mensajero policistrónico de *repA*

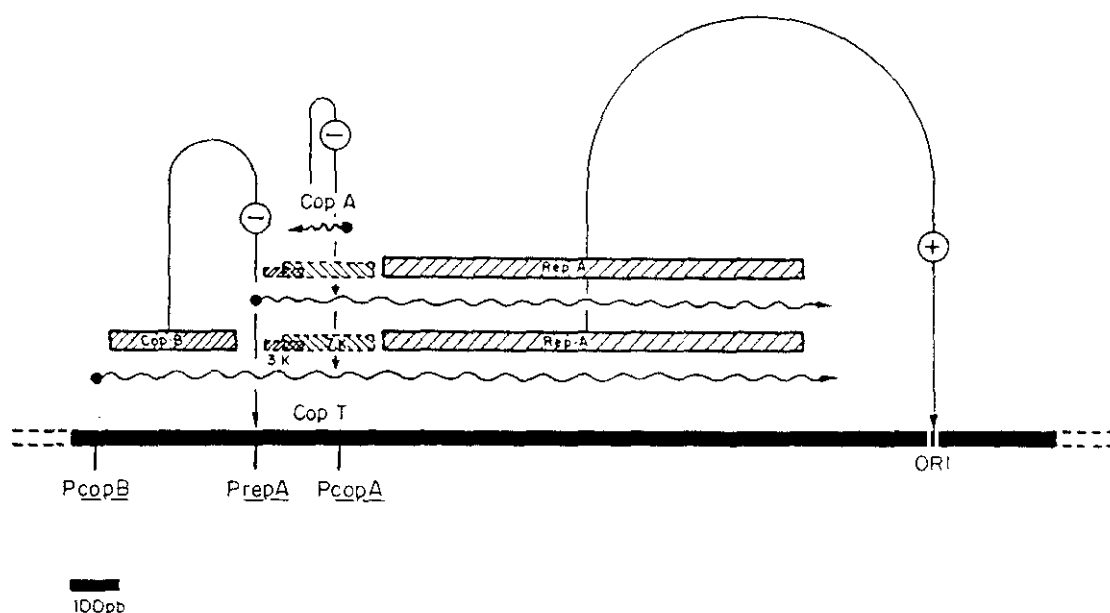


Figura 3. Esquema del replicón básico de R1. Los productos génicos y los principales circuitos que controlan la replicación aparecen señalados. ⊕ indica activación del origen de replicación por la proteína RepA; ⊖ indica control negativo de la replicación ejercido por los productos de los genes *copA* y *copB*. Símbolos: — DNA; ~ RNA; ▬ proteínas; □ □ □ *orf* cuyos productos no han sido identificados. Figura tomada de Berzal (1990).

(Stougaard y cols, 1981; Womble y cols, 1984; Fig. 3). Se ha asumido que la síntesis del RNA-CopA es constitutiva (Nielsen y Molin, 1984), de manera que su concentración depende de la dosis del gen *copA* y, por tanto, del número de copias del plásmido. El ctRNA-CopA actúa bloqueando la síntesis de la proteína iniciadora RepA de tal forma que la tasa de expresión de *repA* por copia plasmídica es inversamente proporcional a la concentración celular de este inhibidor. En otras palabras, la tasa total de síntesis de RepA y, como consecuencia, la frecuencia total de replicación de R1 son aproximadamente constantes e independientes del número de copias del plásmido (Nielsen y Molin, 1984). La interacción entre el RNA-CopA y la región complementaria en el líder del mRNA *repA* es, al igual que ocurre en otros plásmidos que utilizan ctRNAs, la base del mecanismo de control de la replicación para R1. Esta interacción conduce a la formación de un dúplex RNA-RNA estable y, como consecuencia, a la inhibición de la traducción de *repA*, que se inicia a 84 nts de distancia del extremo 5' del RNA-CopA. La estructura secundaria de los dos RNAs implicados en la interacción es muy importante para que ésta tenga lugar. Se sabe, por ejemplo, que la primera interacción tiene lugar a través de 6 nts que aparecen expuestos en los lazos complementarios de sendas estructuras en forma de horquilla que se forman en los RNAs inhibidor y diana (Ohman y Wagner, 1989; Wagner y Nordström, 1986). Se ha sugerido, además, que la acción del RNA-CopA sobre la región complementaria del mRNA *repA*

(denominada CopT) estaría modulada por la traducción de las *orfs 3k* y *7k* (Wagner y cols, 1987; Thomas, 1988). La *orf 7k* solapa con toda la región *copT* (Fig. 3), y se ha propuesto que su traducción (demostrada mediante la utilización de fusiones traducionales) realiza una función moduladora debido a que el paso de los ribosomas a través de CopT desharía la estructura secundaria necesaria para la interacción con el RNA-CopA (Wagner y cols, 1987). Por su parte, la traducción de la *orf 3k* (que solapa sólo con parte de *copT*, Fig. 3) no ha sido verificada, y su implicación en la interacción entre el RNA-CopA y su diana no está, de momento, muy clara (Thomas, 1988; Berzal, 1990).

Aunque es sabido que la formación del dúplex CopA/CopT conduce a la inhibición de la síntesis de RepA, no se conoce, sin embargo, el mecanismo molecular de este bloqueo. Dong y cols (1987) propusieron un modelo que explicaba cómo la interacción del RNA-CopA con la región CopT podía producir un bloqueo de la traducción de *repA* en un sitio físicamente alejado del de la interacción entre ambos RNAs. Este modelo se basa en la distinta conformación estructural que, de acuerdo con las predicciones de análisis por ordenador, puede adoptar el mRNA *repA* según se haya producido, o no, la interacción con el RNA-CopA (Fig. 4). En ausencia del ctRNA, la estructura secundaria final del mRNA *repA* presentaría las señales de inicio de traducción expuestas en regiones de cadena sencilla, lo que permitiría el acceso a las mismas de la maquinaria de traducción y, en consecuencia, la síntesis de RepA (Fig. 4). Por el contrario, si durante la síntesis del mRNA *repA* se produce la interacción de la región CopT con el RNA-CopA, la estructura secundaria final del mensajero mantendría el S.D. y el codón de iniciación de *repA* en regiones de apareamiento intracatenario, y la síntesis de RepA quedaría bloqueada (Fig. 4). Además (y siempre según este modelo), la interacción del RNA-CopA con el mRNA *repA* sólo se podría producir a lo largo de un cierto período de la transcripción, durante el cual los 6 nts de CopT implicados en la interacción primaria de ambos RNAs se mantendrían expuestos en el lazo de una estructura secundaria (Fig. 4). Este periodo de tiempo es considerado como la "ventana útil" para la actuación del ctRNA. Si pasado este momento la interacción no se hubiera producido, habría una reestructuración del mensajero que colocaría los 6 nts de la interacción primaria en una zona de apareamiento intracatenario, cerrándose así la "ventana útil" de acción del RNA-CopA (Fig. 4). La existencia de la estructura transitoria del mRNA útil para la interacción con el ctRNA se vería prolongada por la presencia de un sitio de pausa de la transcripción (caracterizado por una estructura secundaria tipo tallo-lazo muy estable; Dong y cols, 1987). Este sitio está inmediatamente seguido por una secuencia *boxA* (Dong y cols, 1987), la cual es un sitio de reconocimiento de la

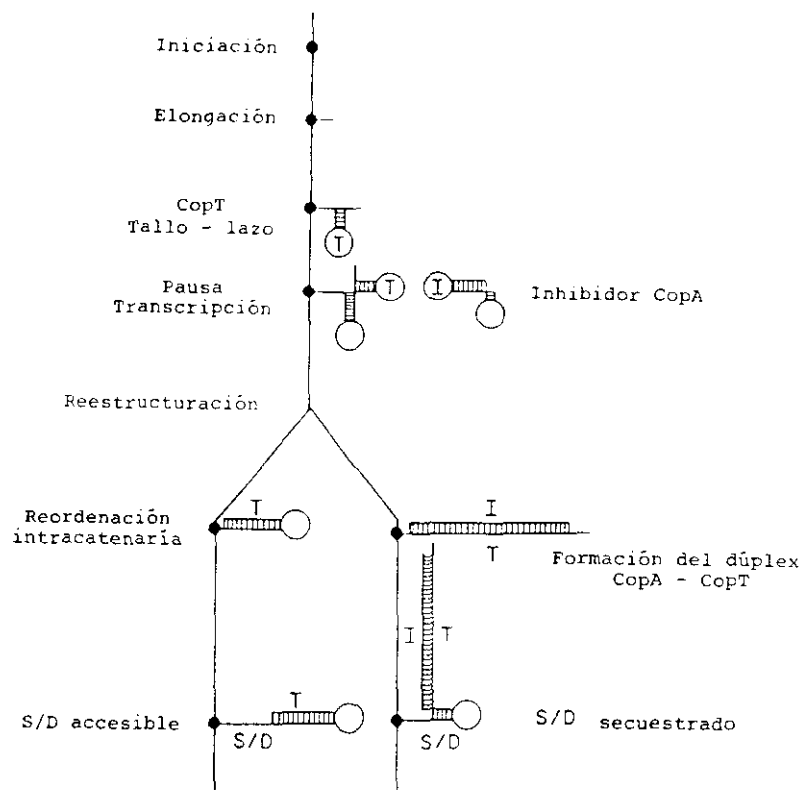


Figura 4. Modelo de Dong y cols (1987) para la inhibición de la síntesis de RcpA por el RNA-CopA de R1. La interacción de CopA con la zona complementaria en la región líder del mRNA *repA* durante la "ventana útil" (antes de la reestructuración del mensajero) conduce al secuestro del S.D. de *repA* en una zona de apareamiento intracatenario. Símbolos: RNA polimerasa (•); seis nts que constituyen la diana de interacción primera en el mRNA *repA* (T); seis nts complementarios a T en el RNA-CopA (I). Según Dong y cols (1987).

proteína NusA de *E.coli* (implicada en los procesos de parada de la transcripción; Friedman y Olson, 1983). Durante el período de atenuación de la transcripción se decidiría la estructura final del mRNA *repA* en función de la interacción o no del RNA-CopA.

Este modelo de apariencia tan sólida no está refrendado, sin embargo, por los datos experimentales obtenidos mediante el análisis estructural del mRNA *repA* sintetizado *in vitro*. Así, Ohman y Wagner (1989) han mostrado que el mensajero adopta la misma estructura secundaria final con independencia de la presencia o ausencia del RNA-CopA durante su síntesis. En dicha estructura final, tanto el S.D. como el codón de iniciación de *repA* se encontrarían expuestos en regiones de cadena sencilla. Tampoco se detectan, durante el proceso de elongación del mRNA *repA*, cambios estructurales que permitan definir una "ventana útil" para la interacción con el RNA-CopA: los 6 nts implicados en la interacción inicial permanecen expuestos en una zona de cadena sencilla durante todo el proceso de transcripción (Ohman y Wagner, 1989). Los autores no

proponen, sin embargo, ningún modelo alternativo que pueda explicar la regulación de la replicación de R1 por la interacción del RNA-CopA con su diana. Por otra parte, se ha mostrado recientemente que el dúplex RNA-CopA/mRNA *repA* es procesado específicamente, tanto *in vivo* como *in vitro*, por la RNasa III de *E.coli*, y que este procesamiento está implicado en la modulación de los niveles de síntesis de la proteína RepA (Blomberg y cols, 1990). Sin embargo, aún no se conoce exactamente cuál es el papel de dicho procesamiento en el control de la replicación de R1 ejercido por el RNA-CopA.

El control de la replicación del plásmido pT181 de *S.aureus* se realiza, al igual que ocurre en R1, a nivel de la síntesis de la proteína iniciadora (RepC), la cual es el factor limitante de velocidad del proceso replicativo (Manch-Citron y cols, 1986). El sistema inhibidor-diana de este plásmido utiliza dos pequeños ctRNAs (RNA I y RNA II, de unos 85 y 150 nts, respectivamente; Kumar y Novick, 1985), que son complementarios a una porción de la región líder del mRNA *repC*. Ambos ctRNAs se inician en el mismo sitio, pero tienen distintos extremos 3' (Novick, 1987). El mecanismo de inhibición de la síntesis de RepC por los RNAs I y II parece estar ahora bien definido. La interacción inicial entre los ctRNAs y el mRNA *repC* tendría lugar a través de los nucleótidos expuestos en los lazos complementarios de una estructura en forma de horquilla, presente tanto en el RNA inhibidor como en su diana (Fig. 5 [a]; Novick, 1989). La acción de los ctRNAs se ejerce a distancia, en el sentido de que su interacción con la diana en el mRNA *repC* induce un cambio conformacional en una región del mensajero alejada de la zona de complementariedad inhibidor-diana. Este cambio en la estructura secundaria conlleva un bloqueo en la síntesis de RepC (Kumar y Novick, 1985; Novick, 1987). La base de este mecanismo regulador es la existencia, en la región líder del mRNA *repC*, de los elementos de secuencia I (también denominado "preemptor"; Novick y cols, 1989), II, III y IV. La secuencia I ("preemptor") puede aparear con el elemento II para dar lugar a la estructura tallo-lazo implicada en la interacción primera con el ctRNA (Fig. 5 [a]). Además, el elemento I comparte una repetición directa de 9 bases con el elemento IV, el cual es complementario al elemento III, de forma que podría darse un apareamiento entre las secuencias I-III. En tal caso, el S.D. de *repC* (incluido en la repetición directa del elemento IV) quedaría expuesto en el lazo de una pequeña estructura secundaria (Fig. 5 [c]). Cuando la transcripción del mRNA *repC* ha progresado lo suficiente, la estructura resultante del apareamiento I-III es más estable que la correspondiente al apareamiento I-II, siendo, en consecuencia, la configuración adoptada por el mensajero (Fig. 5 [c]). Esto es lo que sucedería en ausencia de los ctRNAs, obteniéndose mRNAs funcionales en los que S.D. y codón de iniciación de *repC* se

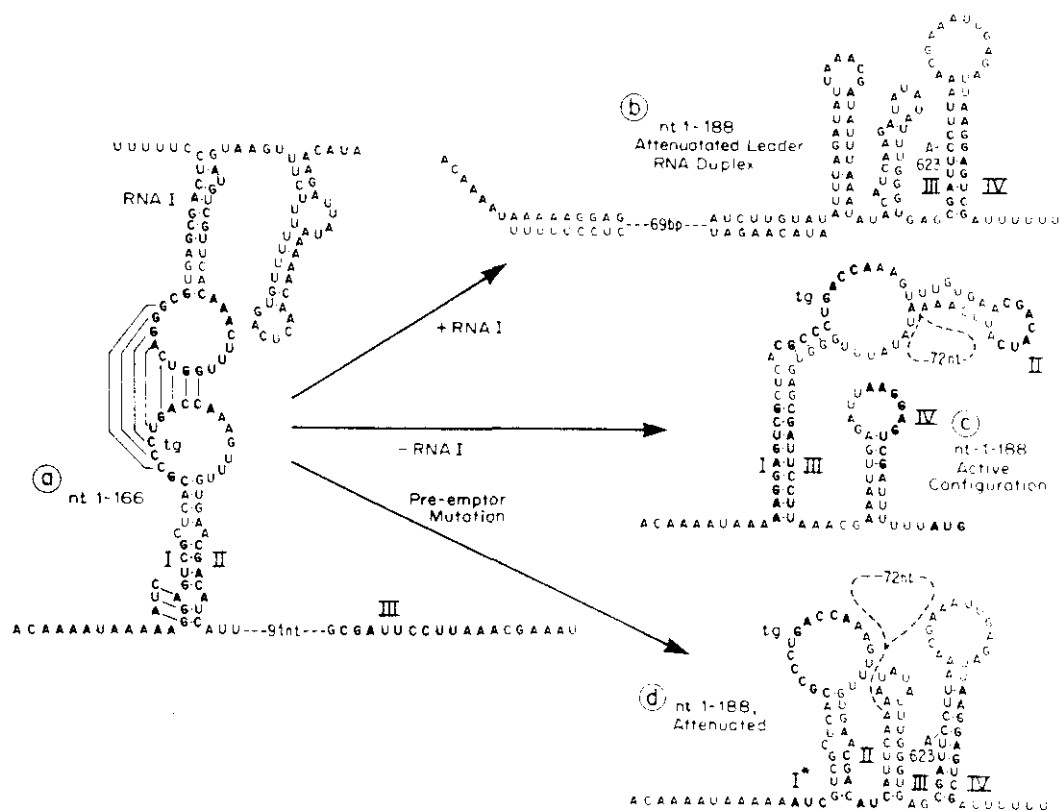


Figura 5. Mecanismo propuesto en pT181 para la regulación de la síntesis de RepC por ctRNAs. Se muestra el plegamiento secuencial de la región líder del mRNA *repC*, con los elementos I, II, III y IV marcados en negritas. (a) Transcrito temprano que presenta el lazo diana (tg) para la interacción con el ctRNA (RNA I); los elementos I y II forman el tallo del lazo diana. (b) El transcrito líder completo, acomplejado con el ctRNA, forma el tallo III-IV, que funciona como terminador de la transcripción; se indica el sitio de una mutación de alto número de copias (*cop-623*) que impide la terminación. (c) Si el transcrito líder es sintetizado en ausencia de ctRNA, la estructura (a) se reorganiza dando lugar al tallo I-III, lo cual evita la formación del terminador III-IV y permite que se complete la transcripción de *repC*. (d) Transcrito líder completo que contiene una sustitución de tres bases en el elemento I ("preemptor"), de manera que el apareamiento I-III queda impedido y se forma el terminador (III-IV) incluso en ausencia de ctRNA. Extraída de Novick y cols (1989).

encuentran accesibles a la maquinaria de traducción. Por el contrario, en caso de producirse la interacción con los ctRNAs, los elementos I y II quedarían bloqueados por hibridación con el inhibidor (Fig. 5 [b]). En consecuencia, el plegamiento basado en el apareamiento I-III no podría formarse, en tanto que el elemento III quedaría libre para aparearse con el IV. Esto daría lugar a un plegamiento alternativo del mensajero, inducido por los ctRNAs, en el que el S.D. de *repC* se encontraría secuestrado en el tallo de la estructura secundaria formada por apareamiento de los elementos III y IV (Fig. 5 [b]). Durante varios años se consideró que la inhibición de la replicación de pT181 por los ctRNAs se debería al bloqueo de la traducción por secuestro del S.D. (Kumar y Novick, 1985). Sin embargo, Novick y cols (1989) han mostrado recientemente que la estructura lazo/tallo III-IV (que es seguida en 3' por una secuencia AU₆) funciona como un terminador de la transcripción, y que, de hecho, la terminación prematura de la síntesis del mRNA *repC* (y no el bloqueo de la traducción) constituye el mecanismo indirecto de

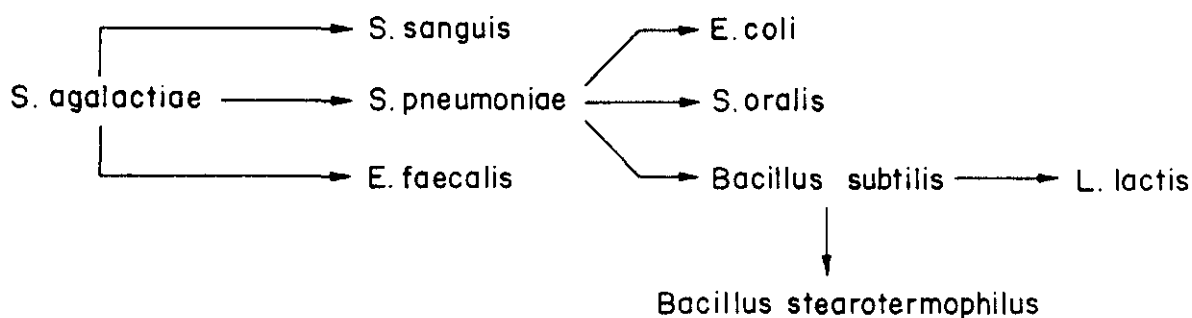
la acción de los ctRNAs de pT181. El mecanismo de control de la replicación de este plásmido es, como vemos, muy similar a los sistemas de atenuación usados para regular la biosíntesis de aminoácidos (Kolter y Yanofsky, 1982).

El plásmido pMV158.

El parental del protagonista de este trabajo, es decir, el plásmido pMV158 fue aislado por Burdett de una estirpe patógena, resistente a Tc, de *Streptococcus agalactiae*. Enseguida se confirmó que pMV158 era quien confería la resistencia a dicho antibiótico (Burdett, 1980), por lo que el estudio de este plásmido adquirió interés clínico. El plásmido pMV158 (5.5 kb) contiene un determinante de resistencia a Tc de tipo *tetL* (Burdett y cols, 1982), cuyo mecanismo de acción parece estar basado en el bombeo del antibiótico fuera de la célula huésped (Burdett, 1986). En el trabajo de Burdett (1980) se describe también que pMV158, aunque no es autotransmisible, puede ser movilizado conjugativamente por una serie de factores sexuales. De esta forma se obtuvieron transconjugantes de *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* que contenían pMV158 (Burdett, 1980). Además, el plásmido fue transferido mediante movilización conjugativa a *Streptococcus pneumoniae* (Smith y cols, 1980), y mediante transformación a *Streptococcus sanguis* (Burdett, 1980) y a *S. pneumoniae* (Saunders y Guild, 1980). Durante el desarrollo de un sistema para el clonaje de genes de pneumococos se realizó la construcción de pLS1, mediante delección *in vitro* del fragmento *EcoRI* B (1.1 kb) de pMV158 (Stassi y cols, 1981). El plásmido pLS1 fue primeramente establecido y analizado en pneumococos, donde se comprobó que su capacidad para conferir Tc' no se había modificado con respecto a pMV158. Trabajos posteriores, tanto en nuestro laboratorio como en otros, han permitido establecer el plásmido pMV158 (o alguno de sus derivados) en una serie de especies bacterianas, incluyendo el huésped gram-negativo *E.coli*. De hecho, éste es uno de los pocos ejemplos de replicones de bacterias gram-positivas capaces de funcionar en microorganismos gram-negativos. Tan sólo se cita en la literatura un caso similar de un plásmido originario de *Streptococcus cremoris* (ahora *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) capaz de replicar por sí solo en *E.coli* (Kok y cols, 1984). Por otra parte, en un trabajo anterior, Goze y Ehrlich (1980) habían mostrado que híbridos entre pBR322 y el plásmido de *S.aureus* pC194 se mantenían con mayor estabilidad que pBR322 en una estirpe *polA(ts)* de *E.coli* a la temperatura restrictiva (a la que pBR322 es incapaz de replicar). Estos resultados han sido interpretados como una prueba de que el replicón de pC194 es capaz de funcionar en el huésped gram-negativo, por más que los autores reconocen no haber podido transferir el plásmido "tal cual" a células de *E.coli*. Goze y Ehrlich (1980)

consideran, sin embargo, que este resultado negativo es debido a la inadecuada expresión del gen *cat* de pC194 en *E.coli*, y no a su incapacidad para replicar en este huésped.

A modo de resumen, el siguiente esquema recoge la información actual acerca de los huéspedes y dirección de transferencia de plásmidos que presentan el replicón pLS1:



Este esquema da idea de la promiscuidad de pLS1 y, en consecuencia, de su utilidad como vector de clonaje. Hasta la fecha, se han clonado más de una veintena de genes usando este replicón.

La secuencia completa de nucleótidos del DNA de pLS1 ha sido determinada (Lacks y cols, 1986) y se muestra, junto con la información que de ella se desprende (putativos promotores y S.D., secuencia de aminoácidos de las ORFs, y secuencias correspondientes a posibles estructuras de terminación de la transcripción), en la Figura 6. La más larga de las *orfs* de pLS1 corresponde al gen *tet*, que determina resistencia constitutiva a Tc. El producto de este gen es un polipéptido de 458 residuos (M_r 50000). El gen *tet* de pLS1 presenta una homología significativa con el gen *tet* del plásmido pT181 de *S.aureus* (Khan y Novick, 1983). La proporción de bases idénticas entre ambos genes es de un 69%, en tanto que la identidad a nivel de aminoácidos es de un 61%. Además, la mayoría de los cambios en aminoácidos son conservativos (Lacks y cols, 1986). Existe, sin embargo, una importante diferencia entre los determinantes de resistencia al antibiótico de pLS1 y pT181: en el primer caso la resistencia a Tc se manifiesta de forma constitutiva, en tanto que en pT181 es inducible por el antibiótico. La inducibilidad de la expresión del gen *tet* de pT181 se debe a la existencia (en este plásmido pero no en pLS1) de un pequeño péptido líder situado a 5' del inicio de la secuencia codificante del gen. Esta organización parece ser común para diversos genes inducibles que determinan resistencia a antibióticos, y cuya expresión es regulada por un mecanismo de atenuación

CTGCAGAACTACTCGCTGATTGGCTAATTCAGCGTATCAAGACAAAGGCGACCAAAATAGCTTGAGTTCCTTTAGAAACAAAAAGAAAGACAGTAGTT 100
 GCACCTACTGCTCTTTCTTTGGCGTTGTGCTTTTGTCTCCGAACTTTTACCGCTAAGCAATATTATATCATGGGGCGAGAAATTTCTGCTAAAATAATGCT 200
 ATAACTGCTTTTGAAGGACCTTCAGCGCTGCGTGGTGAATCTCAATTTACGTAGGCGACTGGAAACCGATAGCTGCTAAAGGCGGCTTGTGAGTGTG 300
 GGGTGTGGGACTGCTTCACTGCTGGGCTGTAAAGACCCCTGATACCTTTTGAATGAGATGACCTTTGGGGTCTTTTGTGTTTTTATGGGAGATGTTGT 400
 GGGGATTTTTTCTCCGAAAAATCTAAAATATGGGGGCTACTACGACCCCTTATAGTCCGAGTCCCAAAATCAAAAAAAGCCCTTTAGCCT 500
 TAGAGCTGCAAGGGTTGAGGCTCGTCAAACTCTCGGCGACTTTTCCGGGACTTTTCCGGGACTTTTATAGAGATTTTTTGGGAAAAATACGAAAAAGATTG 600
 CATTGAGTGACCGGTATGCTACTATAGTTTATAAAATTTTGAAGGCTGACCGATGAAAAAGATTGACGATAACATTAAAGTGAATCGGTACTTGAAA 700
 ATCTTGAAAAATGGCAAGAGAGATGGGGTTATCAAAATCTGCAATGATTCTGTGGCTTGGAAAAATTACAGAAAGGTCAAGAAAAATAAAAAGGCC 800
 AsnLeuGluLysMetAlaArgGluMetGlyLeuSerLysSerAlaMetIleSerValAlaLeuGluAsnTyrLysLysGlyGlnGluLys 900
 GTGCTGGCAGGCACTGGCTAAAGTCAAACTTTCTGGGTATATTATCTTTATGGCTAAAGAAAAAGCAAGATCTTCACTTTTACTTTTATCTCTGAA 1000
 TCAATTTCAAGCGACTGGGAGCTGAAACTTGAAACCGCTGGAGTCCGATTCGCAATTAGTCCATTGCATGATAAGGATAAGAGTACTATCAAGGACAAA 1100
 SerIleProSerAspIrpGluLeuLysLeuGluThrLeuGlyValProMetAlaIleSerProLeuHisAspLysAspLysSerSerIleLysGlyGln 1200
 AATATAAGAAAGCTCATTATCATGTGCTTTATATAGCTAAAAATCCAGTTACTGCGACATAGTGTACGTAAAAAGATTAAATTTTCTGCTGAAAAAG 1300
 LysTyrLysLysAlaHisTyrHisValIleLeuTyrIleAlaLysAsnProValIleAlaAspSerValArgLysLysIleLysLeuLysLysLysSer 1400
 TCTTGAATGGTGCAGGTTGTTCTCAATGTGAAAAATATGATTTGTATTTTAAACGCAGAGCAAGGACGCTATTGCTAAGAGAAACATGTTTATGAT 1500
 LeuAlaMetValIleGlnValIleValAsnValIleGluAsnMetTyrGlyLeuThrHisGluSerLysAspAlaIleAlaLysLysHisValTyrLys 1600
 AAGCGTGATATAAGCTAAATCAATTTTGTATTTGACCTGTTATGTGACGTTAGTGTGAGGAAAGACCGCACTTTTCAATGTGCTGATCCGTTA 1700
 LysAlaAspIleLysLeuIleAsnAsnPheAspIleAspArgTyrValIleThrLeuAspValIleGluGluLysThrGluLeuPheAsnValIleValIleSerLeu 1800
 TCTGCTGCTACACTCTCCAAATATTTTGTATGATTTTCAATGACGAAATGGAGAACTTATGGGTTGACTATAAATTTGGTTAACGAGTAT 1900
 IleArgAlaTyrThrLeuGlnAsnIlePheAspLeuTyrAspPheIleAspGluAsnGlyGluThrTyrGlyLeuThrIleAsnLeuValIleAsnGluValIle 2000
 TGCAGGAAACTCGCTTTATGAAATGTTGTTTGCAGGAGCTTATCAAGCTACTAAGCGTGAACAAAGAACGAAGAGAGATAAAAGTTGATCTTTGT 2100
 AlaGlyLysThrGlyPheMetLysLeuLeuPheAspGlyAlaTyrGlnArgSerLysArgGlyThrLysAsnGluGluArg 2200
 GAAAACACAGAACTAAAGCAAGCTAAATGCTAATAGCTAGCTAGCTGATTTTATGACCGATGATGAAGAAAGAAATTTGAACTTTAGTTTATAT 2300
 GTGGTAAAAATGTTTAACTCAAGTTTATGAGGCAATTAATTAAGCTGTAATTAATGAACAGGCTCAATTAAGAGAGGGAAGCGTATCATTAACCCCTAT 2400
 AAACACGCTCTGCCCTCATTATTGAGGGGTGAAATGTGAATACATCCATTCACAACTCGAATTTACGACACCAACCAATTTTAAATTTGGCTTTGCATTTT 2500
 ATCTTTTTTACGGTATTAATGAAATGGTTTGGACGCTCTATTGATGATTTGCAAAATGATTTTAAATAAACCCACTCGGAGTACACCGGCTGCAAC 2600
 SerPhePheSerValIleLeuAsnGluMetValIleLeuAsnValIleSerLeuProAspIleAlaAsnAspPheAsnLysProProAlaSerThrAsnTrpValIle 2700
 ACAGCCTTTATGTTAACTTTTCCATTGGAACACCTGATATGGAAGCTATCTGATCAATTTAGGATCAAAAAGGTTACTCTTATTTGGAATTATAATA 2800
 ThrAlaPheMetLeuThrPheSerIleGlyThrAlaValTyrGlyLysLeuSerAspGlnLeuGlyIleLysArgLeuLeuPheGlyIleIleIle 2900
 ATTGTTTGGGCTCGGTAATGGGTTTGTTCGCCATTCTTTCTTTCTTACTTATATGCTGCTTTTATCAAGGGCTGGTCCACTGCTGCTTCCAGC 3000
 AsnCysPheGlySerValIleGlyPheValGlyHisSerPhePheSerLeuLeuIleMetAlaArgPheIleGlnGlyAlaGlyAlaAlaPheProAla 3100
 ACTCGTAATGGTGTAGTTGCGCGCTATATTCGCAAGCAAAATAGGGGTAAAGCAATTTGGTCTTATTGGATCGATAGCTGCGGAGAGAGGCTCGGT 3200
 LeuValMetValIleValIleAlaArgTyrIleProLysGluAsnArgGlyLysAlaPheGlyLeuIleGlySerIleValAlaMetGlyGluGlyValIle 3300
 CCAGCATTGGTGAATGATAGCCATTATATTCATTTGGTCTTCTTCTACTCTTCTATGATAACAATTATCACTGTTCCGCTTTCTTATGAAATTA 3400
 ProAlaIleGlyMetIleAlaHisTyrIleHisTrpSerTyrLeuLeuIlePheMetIleThrIleIleThrValIleProPheLeuMetLysLeu 3500
 TAAAGAAAGAGTAAGGATAAAAGGTCATTTGATATCAAGGAATTTACTAATGCTCTGAGGCTGTTATTTTATGTTGTTTACAACATCATATAG 3600
 LeuLysLysGluValArgIleLysGlyHisPheAspIleLysGlyIleIleLeuMetSerValIleValIlePhePheMetLeuPheThrThrSerTyrSer 3700
 CATTCTTTTCTTATCGTTAGCGTCTGCTGCTATTCCTGATATTTGTAACACATATCAGGAAAGTAACAGATCCTTTTCTTATGATCCCGGATAGGGAATAA 3800
 IleSerPheLeuIleValIleSerValIleLeuSerPheLeuIlePheValLysHisIleArgLysValIleThrAspProPheValIleAspProGlyLeuGlyLysAsn 3900
 ATACCTTTTATGTTGGAGTTCTTTGTGGGGAATTAATTTGGAACAGTAGCAGGGTTTGTCTCTATGTTCTCTTATGATGAAAGATGTTCCAGCAG 4000
 IleProPheMetIleGlyValLeuLysGlyGlyIleIlePheGlyThrValIleAlaGlyPheValSerMetValIleProTyrMetLysPheValHisGln 4100
 TAAGTACTGCGCAATCGGAAGTGAATTTTCCCTGCAACAAATGAGTGTCTATTTTCCGGCTACATTTGGTGGGATCTTGTGATCAAGAGGTTCC 4200
 LeuSerThrAlaGluIleGlySerValIleIlePheProGlyThrMetSerValIleIlePheGlyTyrIleGlyGlyIleLeuValAspArgGlyGlyPro 4300
 TTTATAGCTGTTAAACATCGGATTCATTTCTTCTGTTAGCTTTTAACTGGTCTCTTCTTTTAGAACAACATCATGGTTCATGACATATATAAT 4400
 LeuTyrValIleLeuAsnIleGlyValThrPheLeuSerValIleSerPheLeuThrAlaSerPheLeuLeuGluThrThrSerTrpPheMetThrIleIleIle 4500
 GTATTTGTTTATGTTGGGCTTCTGTTCCACAAAACAGTTATATCAACAAITTTGTTCAAGTAGCTTGAACAGCAGGAAGCTGGTCTGGAATGACTTTGC 4600
 ValPheValGlyLeuGlyLysGlnLysAlaThrLysLeuGluAlaLysAlaLeuAsnSerGluLeuArgGluLeuLysProLysLysAsnPheLeuGly 4700
 TTAACCTTACCAGCTTTTATCAGAGGGAACAGGTATTGCAATTTGAGGTGGTTTATTATCCATACCTTACTTGTATCAAGGTTGTTACCTTATGGAAGT 4800
 LeuAsnPheThrSerPheThrGlyThrGlyIleAlaIleLysGlyLeuLeuSerIleProLeuLeuAspGlnArgLeuLeuMetProMetGluVal 4900
 TGATCAGTCAACTTATCTGATATAGTAATTTCTTATTAATTTTTCAGGAATCTTGCTATTAAGTGGCTGGTACCTTGAATGTATATAACATTTCTCAA 5000
 AspGlnSerThrTyrLeuTyrSerAsnLeuLeuLeuPheSerGlyIleIleValIleIleSerTrpLeuValIleThrLeuAsnValTyrLysHisSerGln 5100
 AGGGATTCTAAATCGTTAAGGATCAACTTTGGGAGAGAGTTCAAAATTTGATCTTTTATTAACAGGAATCAAGAGGGCAATCGCTGATATGGAAC 5200
 ArgAspPhe 5300
 TCAAGAGGAACTCTTGAAGAAATATCATGACCGCTTTTGTGATGAGAGAACAGGGAGTTGAACAAATGACACGGAAGCTTTTGGCATGAAAAAGAG 5400
 TTTGCTGATATGTTTGAAGTTCAATCTCCGATACGTGAAACAACTAACCAAGAAAAATGGAGTGGTTAAAGAAACAGTACCAAGAGAGCTGAAAAAAC 5500
 fMetGluValGlnIleSerProIleArgGluThrAsnGlnGluLysMetAspTrpLeuArgLysGlnTyrGlnGluLeuLysLys 5600
 TAGAATCGTCTAAAAAGCCCTAGAGACGATTAAGCCATTTAGAAGAGTTCCTTGATAAAAAACCAAGGAATATATTAATATCGATTCTGAGGCTC 5700
 LeuGluSerSerLysLysProLeuGluAspAspLeuSerHisLeuGluGluLeuLeuAspLysLysThrLysGlyTyrIleLysIleAspSerGluAlaSer 5800
 TGAGAGGGCTCAGAGCTATCAAGCGCAGGGATATATAATACCTAGAAAAATCTCCGAAGAGCTTAGAAGCGCAATAGAGTGTATTAGAGCTGAT 5900
 GluArgAlaSerGluLeuSerLysAlaGluGlyTyrIleAsnThrLeuGluAsnHisSerLysSerLeuGluAlaLysIleGluCysLeuGluSerAsp 6000
 AATCTACAATTTGAAAAACAAAAGGCGACAAAACCTGAAAGCGAAAGCGTTGAACGAGAGTGAAGTCCGAGAACTAAAGCCATAAGAGAAATTTCTAGGAA 6100
 AsnLeuGlnLeuGlyLysGlnLysAlaThrLysLeuGluAlaLysAlaLeuAsnSerGluLeuArgGluLeuLysProLysLysAsnPheLeuGly 6200
 AAGAGCATTATGAGTTAAGTCTGAACAAATTTGAAGGTTGAAGGCAGAGCTTATCTGATGAACTCTATTGCACCAACAAGATATTGAAGTGGAGCA 6300
 LysGluHisTyrGluLeuSerProGluGlnPheGluGlyLeuLysAlaGluValTyrArgSerArgThrLeuLeuHisHisLysAspIleGluLeuGluGln 6400
 AGCAAAACGTCAGATCTCTGAGAGCCTCTAAAACTATTTACAGCTAGTTTGAAGCGAGCTAAGGAAAAAGCTAAAGGTGAGAGTATAGACGCTT 6500
 AlaLysArgGlnValIleSerLeuArgAlaSerLysAsnTyrPheThrAlaSerLeuGluArgAlaLysGluLysAlaLysGlyGluSerIleAspArgLeu 6600
 AAAAGCGAAATAAGCGACTAAAAACGAAATTTCAATTTACGTCAGCAAAATGACAAGATGCTAGGGAATTAAGAGAGTTAATGCTTGATAAGCCT 6700
 LysSerGluIleLysArgLeuLeuAsnGlnAsnSerIleLeuArgGlnGlnAsnLysMetLeuGlyLysLeuArgGluLeuMetProAspLysAla 6800
 TTAAGAAATTTGTTATCAGAACTTAAGCGGATTAAGCCAAATCGTGAATATAATAAAAAGGCTATTGAAAAGAGCTTGTCTGAGCGATTATCGCGTGA 6900
 PheLysLeuLeuLeuLeuSerGluLeuLysAlaIleLysProIleValIleAsnIleLysLysAlaIleGluLysSerLeuPhe 7000
 AGCTATTGACAATAGCAGTGCAGAGATCGCTAGGAGTCCGAGCGGCAAGCGCTTTAGCGTTCCGAGCGGACCGGCAAGGACGGCAGTCACTGG 7100
 TTACTTCTTCTCAATAGACCATGGAATAAAAGCGTCAAAAGCTTGTAGTGGATGATACCTATGGAATCTATTGCGCTTTTGTACTTTTGTCTATAA 7200
 TTTAAGTGTGCCAGTCTTCCGTCAGGTAATGCAACTTACGAGGAGTGGAGGTTGTGAAGACATTCTCGAGCTTGTCTTGTCCCTTTTGTGCTT 7300
 GCGCTTG-3'

Figura 6. Secuencia de nucleótidos del DNA de pLS1. Se muestra la secuencia de la cadena codificante del plásmido, comenzando en el sitio de referencia *Pst*I y extendiéndose en dirección 5'→3'. Los putativos polipéptidos codificados por las cuatro *orfs* se indican debajo de las correspondientes secuencias de nucleótidos. Los putativos promotores y sitios de unión de los ribosomas se representan en negritas, en tanto que las secuencias correspondientes a posibles terminadores de transcripción están subrayadas. Tomada de Lacks y cols (1986).

traduccional (Rogers y cols, 1990).

Recientemente, dos grupos de trabajo han determinado, de forma independiente, la secuencia de nucleótidos del fragmento EcoRI B de pMV158 (Priebe y Lacks, 1989; van der Lelie y cols, 1989). Como se recordará, este fragmento fue eliminado durante la construcción de pLS1. El análisis de la secuencia de DNA ha revelado que en el fragmento EcoRI B de pMV158 existe una *orf* (*mob*) que podría codificar una proteína de 58 kDa. La proteína Mob es homóloga en su mitad N-terminal a las proteínas Pre (para recombinación plasmídica) codificadas por los plásmidos de *S.aureus* pT181 y pE194 (Gennaro y cols, 1987). Novick y sus colaboradores (Novick y cols, 1981; Gennaro y cols, 1987) han encontrado que las proteínas Pre están implicadas en procesos de recombinación plasmídica cointegrativa independiente de RecA y específica de los sitios RS_A (que se encuentran adyacentes al extremo 5' de la secuencia codificante *pre*). Trabajos posteriores han evidenciado que la proteína Mob de pMV158 es necesaria para la movilización conjugativa de este plásmido (van der Lelie y cols, 1990; Priebe y Lacks, 1989). Según proponen Priebe y Lacks (1989), la proteína Mob produciría una rotura monocatenaria en el origen de transferencia (secuencia RS_A) de pMV158; esto representaría la primera etapa del proceso de movilización conjugativa del plásmido. Dada la evidente homología de secuencia entre los sistemas RS_A/mob de pMV158 y RS_A/pre de algunos plásmidos de *S.aureus*, Priebe y Lacks (1989) sugieren que las proteínas Pre tendrían la función propuesta para Mob. Por tanto, la recombinación mediada por Pre en los sitios RS_A podría ser más una consecuencia de la rotura del DNA por la proteína que la auténtica función primaria del sistema *pre*.

El objetivo de esta Tesis ha sido estudiar la replicación de pLS1 y los circuitos que intervienen en la regulación de este proceso. Dos hechos conferían especial interés a este tema. Por un lado, la escasez de datos acerca de la replicación de los plásmidos de bacterias gram-positivas. Por otro lado, el amplio espectro de huésped de pLS1, que permitía estudiar su mecanismo replicativo en diferentes especies bacterianas de forma comparativa. El momento para iniciar este proyecto era además el adecuado, pues el plásmido pLS1 acababa de ser totalmente secuenciado, lo que facilitaba, indudablemente, nuestra tarea. Sin embargo, aparte de los datos derivados de la secuencia, nada se conocía acerca de los mecanismos replicativos de pLS1. El trabajo descrito en esta Tesis será desarrollado de acuerdo con la siguiente estructura: Primeramente analizaremos el espectro de huésped de pMV158 y sus derivados, así como las características generales de estos plásmidos en los distintos microorganismos utilizados como huéspedes. A

continuación nos centraremos en las características de la replicación *in vitro* de pMV158, pLS1 y pLS5, en extractos de *E.coli*. En tercer lugar estudiaremos el origen y dirección de replicación de la cadena líder, deducidos tanto *in vivo* como *in vitro*. Tras analizar el origen de replicación de la cadena retrasada, y los efectos fenotípicos derivados de su delección, abordaremos la caracterización de la proteína iniciadora de la síntesis de la cadena líder. Para concluir, trataremos el control de la replicación (y por tanto del número de copias) de estos plásmidos. A este nivel analizaremos el papel ejercido tanto por un pequeño represor transcripcional (la proteína RepA), como por un pequeño ctRNA (el RNA II).

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

Las estirpes bacterianas y plásmidos utilizados se muestran en las Tablas 1 y 2. Salvo que se indique otra cosa, las estirpes rutinariamente usadas fueron: *S.pneumoniae* 708, *B.subtilis* MB11 y *E.coli* C600.

TABLA 1: Estirpes utilizadas

Estirpe bacteriana	Genotipo	Procedencia
<i>S.pneumoniae</i> 708	<u>end-1</u> <u>exo-2</u> <u>trt-1</u> <u>hex-4</u> <u>malM594</u>	S.A.Lacks
<i>S.pneumoniae</i> 560	<u>thy-7</u> <u>ltr-1</u> <u>str</u> <u>nov</u>	S.A.Lacks
<i>B.subtilis</i> MB11	<u>lys-3</u> <u>metB-10</u> <u>hisH-2</u>	Colección del laboratorio
<i>B.subtilis</i> MB63	<u>trpC-2</u> <u>thy</u>	Colección del laboratorio
<i>B.subtilis</i> CU403	<u>thyA</u> <u>thyB</u> <u>metB</u> <u>div-IVB1</u>	J.Reeve
<i>E.coli</i> C600	<u>thr-1</u> <u>thi-1</u> <u>leu-6</u> <u>lacY1</u> <u>fhuA21</u> <u>supE44</u>	R.Díaz
<i>E.coli</i> BL21	F ⁻ <u>r_B</u> <u>m_B</u> <u>gal</u> <u>ompT</u>	F.W.Studier
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <u>r_B</u> <u>m_B</u> <u>gal</u> <u>ompT</u> (int::PlacUV5-T7gen1 <u>imm21</u> <u>nin5</u>)	F.W.Studier
<i>E.coli</i> H560rev	<u>thyA</u> <u>arg</u> <u>met</u> <u>endA</u>	S.A.Lacks
<i>E.coli</i> XL1-Blue	<u>hsdR17</u> (r _k ⁻ m _k ⁺) <u>lambda</u> ⁻ (lac) [F' <u>proAB</u> <u>lacI</u> ^q <u>ΔM15</u> Tn10(<u>tet</u>)] <u>recA1</u> <u>relA1</u> <u>endA1</u> <u>gyrA96</u> <u>thi</u> <u>supE44</u>	Stratagene

TABLA 2: Plásmidos utilizados

Plásmido	Tamaño (pb)	Marcador	Observaciones	Procedencia
pMV158	5542	Tc ^r	Plásmido natural aislado de <u>S.agalactiae</u>	V.Burdett
PLS1	4408	Tc ^r	Deleción del fragmento <u>EcoRI</u> B de pMV158	Este laboratorio
PLS5	4076	Tc ^r	Deleción <u>in vivo</u> de un derivado de PLS1 en <u>B.subtilis</u>	Este trabajo
PLS4	3138	Tc ^r	Deleción del fragmento <u>HindIII-NcoI</u> menor de pLS5	Este trabajo
PLS4-t	3451	Tc ^r	Terminador bidireccional de ϕ 29 clonado en <u>EcoRI</u> de pLS4	Este trabajo
PLS1 <u>cop7</u>	4408	Tc ^r	Transversión C \rightarrow A en coordenada 743 de pLS1	Este trabajo
PLS7	3470	Tc ^r	Deleción del fragmento <u>HindIII-NcoI</u> menor de pLS1 <u>cop7</u>	Este trabajo
PLS1 Δ 24	3838	Tc ^r	Deleción por BAL31 de pLS1 linearizado en <u>BanI</u>	Este trabajo
<u>PLS5cop11</u>	4080	Tc ^r	Construido a partir de pLS5 por relleno del sitio único <u>ApaI</u>	Este trabajo
PLS1 Δ A4	4240	Tc ^r	Deleción por BAL31 de pLS1 linearizado en <u>BglI</u>	Este trabajo
PLS1 Δ A12	4256	Tc ^r	Deleción por BAL31 de pLS1 <u>cop7</u> linearizado en <u>BglI</u>	Este trabajo
PLS1 Δ A15	4313	Tc ^r	Deleción por BAL31 de pLS1 linearizado en <u>BglI</u>	Este trabajo
PLS1 Δ A21	4257	Tc ^r	Deleción por BAL31 de pLS1 <u>cop7</u> linearizado en <u>BglI</u>	Este trabajo
PLS1 Δ A23	4258	Tc ^r	Deleción por BAL31 de pLS1 <u>cop7</u> linearizado en <u>BglI</u>	Este trabajo
PLS1 Δ A34	4245	Tc ^r	Deleción por BAL31 de pLS1 linearizado en <u>BglI</u>	Este trabajo
pJS37	7315	Tc ^r Cm ^r	Híbrido entre pLS1 y pC194	Este laboratorio
pJS38	7317	Tc ^r Cm ^r	Construido a partir de pJS37 por relleno del sitio único <u>AccI</u>	Este laboratorio
pJS3 <u>cop7</u>	4191	Cm ^r	Deleción <u>in vivo</u> de pJS37. Contiene la transversión C \rightarrow A (coordenada 743 de pLS1)	Este trabajo
pJS30	3859	Cm ^r	Fragmento <u>PstI</u> A de pJS3 <u>cop7</u> ligado al fragmento <u>PstI</u> B de pLS5	Este trabajo
pJS30 <u>cop7</u>	3859	Cm ^r	Fragmento <u>ApaI-HindIII</u> grande de pJS3 <u>cop7</u> ligado al fragmento <u>ApaI-HindIII</u> pequeño de pLS5	Este trabajo
pJS4	3354	Cm ^r	Deleción <u>in vivo</u> de pJS37	Este laboratorio
pC194 <u>cop</u>	2907	Cm ^r	Mutante de copia de pC194	Este laboratorio
pCGA1 <u>cop7</u>	3319	Cm ^r	Fragmento <u>AluI</u> (505)- <u>AluI</u> (921) de pLS1 <u>cop7</u> clonado en <u>HindIII</u> de pC194 <u>cop</u>	Este trabajo
pCGA3	3199	Cm ^r	Fragmento <u>AluI</u> (505)- <u>BglI</u> (804) de pLS1 clonado en <u>HindIII</u> de pC194 <u>cop</u>	Este trabajo

TABLA 2 (continuación): Plásmidos utilizados

Plásmido	Tamaño (pb)	Marcador	Observaciones	Procedencia
pCGA3 _{cop7}	3199	Cm ^r	Fragmento <u>AluI</u> (505)- <u>BglI</u> (804) de pLS1 _{cop7} clonado en <u>HindIII</u> de pC194 _{cop}	Este trabajo
pCGA30	3151	Cm ^r	Deleción del fragmento pequeño <u>ApaI</u> - <u>HgaI</u> de pCGA3	Este trabajo
pCGA6	3118	Cm ^r	Fragmento <u>AluI</u> (62)- <u>AluI</u> (277) de pLS1 clonado en <u>HindIII</u> de pC194 _{cop}	Este trabajo
pCGA7	3088	Cm ^r	Fragmento <u>AluI</u> (320)- <u>AluI</u> (505) de pLS1 clonado en <u>HindIII</u> de pC194 _{cop} (orientación a)	Este trabajo
pCGA8	3088	Cm ^r	Fragmento <u>AluI</u> (320)- <u>AluI</u> (505) de pLS1 clonado en <u>HindIII</u> de pC194 _{cop} (orientación b)	Este trabajo
pCGA9	3070	Cm ^r	Fragmento <u>StyI</u> (758)- <u>AluI</u> (921) de pLS1 clonado en <u>HindIII</u> de pC194 _{cop}	Este trabajo
pCGA11	3139	Cm ^r	Fragmento <u>NcoI</u> - <u>ApaI</u> pequeño de pLS1Δ24 clonado en <u>HindIII</u> de pC194 _{cop} (orientación b)	Este trabajo
pCGA12	3139	Cm ^r	Fragmento <u>NcoI</u> - <u>ApaI</u> pequeño de pLS1Δ24 clonado en <u>HindIII</u> de pC194 _{cop} (orientación a)	Este trabajo
pET5	~4030	Ap ^r	Vector de transcripción basado en pBR322	F.W.Studier
pLS21	~8100	Ap ^r Tc ^r	Híbrido pLS5-pET5	Este laboratorio
pLS22	~7050	Ap ^r Tc ^r	Deleción del fragmento <u>PstI</u> C de pLS21	Este laboratorio
pLS19	~7050	Ap ^r	Deleción de los dos fragmentos <u>BclI</u> menores de pLS21	Este trabajo
pLS18	~6100	Ap ^r	Deleción del fragmento pequeño <u>HindIII</u> - <u>NcoI</u> de pLS19	Este trabajo
pLS20	~5020	Tc ^r	Deleción del fragmento <u>SalI</u> - <u>PvuI</u> mayor de pLS21	Este trabajo
pLS02	~5020	Tc ^r	Reorientación de los fragmentos <u>EcoRI</u> de pLS20	Este trabajo
pUC19	2686	Ap ^r	Vector de clonaje	Biolabs
pUC-A	~2950	Ap ^r	Fragmento <u>ApaI</u> (607)- <u>XmnI</u> (902) de pLS1 clonado en el sitio <u>SmaI</u> de pUC19	Este trabajo
pLG339	~6200	Tc ^r Km ^r	Vector de bajo número de copias	P.López
pLSMrepA	~6000	Km ^r	Gen <u>repA</u> clonado en pLG339	Este trabajo
pNM482	~8600	Ap ^r	Plásmido para fusiones traduccionales con <u>lacZ</u>	J.C.Alonso
pLSMlac5	~9900	Ap ^r	Fragmento <u>Hinfl</u> B de pLS5 (coordenadas 3488 a 685 de pLS1) clonado en el sitio único <u>BamHI</u> de pNM482	Este trabajo
pBR322	4361	Ap ^r Tc ^r	Plásmido de <u>E.coli</u> basado en replicón ColE1	Biolabs
pBAG1	5497	Ap ^r Cm ^r	<u>cat</u> de pJS3 clonado en pBR322	Este trabajo
pKN182	~6500		Miniderivado de un mutante de copias de R1	R.Díaz
ColE1	~13000	Ap ^r	Replicón ColE1 con un marcador de resistencia a ampicilina	R.Díaz
pT181	4437	Tc ^r	Plásmido natural de <u>S.aureus</u>	R.P.Novick

2. MEDIOS DE CULTIVO.

2.1. Medio de cultivo de *S.pneumoniae*.

El medio AGCH (Lacks, 1966) fue la base para el crecimiento de las estirpes de *S.pneumoniae*.

Medio AGCH:

Hidrolizado ácido de caseína	5 g
Hidrolizado enzimático de caseína	1 g
L-cisteína-HCl	40 mg
L-triptófano	6 mg
L-asparagina	50 mg
L-glutamina	10 mg
Adenina	5 mg
Cloruro de colina	5 mg
Pantotenato cálcico	1.2 mg
Acido nicotínico	0.3 mg
Piridoxina-HCl	0.3 mg
Tiamina-HCl	0.3 mg
Riboflavina	0.14 mg
Biotina	0.6 mg
K ₂ HPO ₄	8.5 g
NaC ₂ H ₃ O ₂	1.25 g
NaHCO ₃	0.4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂	0.6 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.5 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.5 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.5 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.2 mg
Albúmina bovina (fracción V)	0.5 g
Catalasa	3000 u
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l
pH 7.5	

Como medio de cultivo líquido se empleó AGCH suplementado con sacarosa y extracto de levadura (concentraciones finales de 0.3% y 0.2%, respectivamente). En los experimentos de marcaje *in vivo* del DNA, se suprimió el extracto de levadura.

Para el crecimiento en medio sólido se utilizó AGCH suplementado con sacarosa y extracto de levadura, al cual se añadió Bacto-Agar al 1% (para la capa basal) o al 0.75% (para la sobrecapa).

Cuando fue requerido, los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos. Salvo que se indique otra cosa, la selección aplicada fue: Tc 1 µg/ml; Cm 3 µg/ml.

2.2. Medios de cultivo de *B.subtilis*.

Los medios de cultivo para la puesta en competencia y transformación de las estirpes MB11 y CU403, así como para la obtención de minicélulas, están basados en los descritos por Young y Wilson (1972).

Sales SP(5x) :

K_2HPO_4	70 g
KH_2PO_4	30 g
$(NH_4)_2SO_4$	10 g
Citrato trisódico	5 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l

Medio GM1 :

Sales SP(5x)	200 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
D-glucosa	5 g
Extracto de levadura	1 g
Hidrolizado de caseína libre de vitaminas	0.2 g
Requerimientos auxotróficos de la estirpe	50 mg
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l
pH 7.0	

Medio GM2 :

GM1	1 l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6 g

Medio sólido :

Sales SP(5x)	200 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
D-glucosa	5 g
Timina	40 mg
Cada uno de los 19 aminoácidos (salvo metionina)	50 mg
Bacto-Agar	15 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l

Medio completo para minicélulas :

GM1	1 l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	75 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	17 mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1.4 mg

Sales para minicélulas :

Sales SP(5x)	200 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	17 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.4 mg
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l

Por su parte, para la puesta en competencia y transformación de la estirpe MB63, se utilizaron los medios descritos por Joenje y cols (1973).

Medio MBW :

Sales SP(5x)	200 ml
D-glucosa	5 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l

Medio BWC :

Sales SP(5x)	200 ml
D-glucosa	5 g
L-valina	50 mg
L-lisina	50 mg
L-treonina	50 mg
L-asparagina	50 mg
L-metionina	50 mg
Glicina	50 mg
L-arginina	50 mg
L-histidina	50 mg
Timina	20 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.25 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l

Este medio, sin timina y suplementado con el resto de los requerimientos auxotróficos de la estirpe, fue empleado para el marcaje *in vivo* del DNA.

Medio sólido :

BWC	1 l
Bacto-Agar	15 g

Para el crecimiento rutinario de todas las estirpes de *B.subtilis* se utilizó el medio TY.

Medio TY :

Tryptona	10 g
Extracto de levadura	5 g

NaCl	5 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l
pH 7.3	

El medio TY fue suplementado con Bacto-Agar al 1.5% para su utilización como medio de cultivo sólido.

Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a las concentraciones finales de 10 µg/ml para Tc y 20 µg/ml para Cm.

2.3. Medios de cultivo de *E.coli*.

Para el marcaje *in vivo* de DNA, así como para el marcaje y purificación de proteínas se empleó el medio mineral definido M9, preparado según describen Maniatis y cols (1982).

Medio M9 :

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g

El pH se ajusta a 7.4, y esta mezcla de sales se esteriliza independientemente del resto de los componentes:

CaCl ₂ . 2H ₂ O	14.5 mg
MgSO ₄ . 7H ₂ O	246 mg
D-glucosa	2 g

Cuando fue necesario, este medio se suplementó con los requerimientos auxotróficos de cada estirpe.

Para el crecimiento rutinario, así como para la puesta en competencia y transformación de las estirpes de *E.coli*, se utilizó el medio LB descrito por Luria y Berrows (1957).

Medio LB :

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	1 g
D-glucosa	1 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l
pH 7.5	

Para la preparación de extractos de replicación *in vitro* se empleó el medio LBR.

Medio LBR :

Consiste en el medio LB al que se suplementa con D-glucosa hasta una concentración final del 0.2% y se le ajusta el pH a 8.0 con KOH 5 M.

Cuando alguno de estos medios se utilizó para el crecimiento en sólido, se añadió Bacto-Agar al 1.5%

Cuando se añadieron antibióticos, las concentraciones finales de éstos fueron:

Tc 10 $\mu\text{g/ml}$

Cm 15 $\mu\text{g/ml}$

Ap 50 $\mu\text{g/ml}$, excepto para los derivados de pET5, en los que la concentración final fue de 200 $\mu\text{g/ml}$.

Kanamicina 25 $\mu\text{g/ml}$.

3. TAMPONES Y SOLUCIONES.

Se describen aquí los tampones y soluciones de uso general. Aquellos que sean específicos de una técnica concreta se detallarán en el apartado correspondiente del capítulo de Métodos.

Tampón TE(10:1): Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1 mM.

Tampón TAE: Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM. El pH resultante es 8.1.

Tampón TBE: Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2.5 mM. El pH resultante es 8.3.

Tampón de carga SLB(5x): Tris-HCl 250 mM pH 8.8, SDS 5%, EDTA 10 mM, β ME 25%, glicerol 50%, azul de bromofenol 1 mg/ml.

Colorante de carga SBE(3x): Sacarosa 30%, azul de bromofenol 0.075%, EDTA 2.5 mM.

Colorante de carga BXGE(10x): Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 60%, EDTA 10 mM.

Colorante de carga CEC(3x): Azul de bromofenol 0.02%, glicerol 50%, EDTA 2.5 mM.

Colorante de carga BXF(1x): Formamida desionizada 80%, NaOH 10 mM, azul de bromofenol 0.1%, xilencianol 0.1%, EDTA 1 mM.

Solución SSC(20x) : NaCl 3 M, citrato trisódico 0.3 M.

Tampones de enzimas modificantes del DNA :

Los tampones para la actuación de endonucleasas de restricción y otros enzimas modificantes del DNA (DNA ligasa de T4, BAL31, nucleasa S1, etc...) fueron los recomendados por las casas suministradoras, preparándose como soluciones 10 veces concentradas.

4. ENZIMAS Y OTRAS PROTEINAS.

Los enzimas de restricción, la DNA ligasa del fago T4, las nucleasas BAL31 y S1, la fosfatasa alcalina de ternera, la polinucleótidoquinasa del fago T4, la DNA polimerasa I de *E.coli* y su fragmento Klenow fueron suministrados por las firmas comerciales: New England Biolabs, Boehringer y Amersham.

La RNA polimerasa de *E.coli* fue de Promega.

La DNasa I libre de RNasas y proteasas se obtuvo de Cooper Biomedical.

La proteinasa K, la pronasa, la RNasa A, la lisozima, la seroalbúmina bovina (fracción V) y los patrones de peso molecular de proteínas fueron suministrados por Sigma.

5. MATERIAL FOTOGRAFICO Y DE AUTORADIOGRAFIA.

Para fotografiar los geles de DNA teñidos con EtBr, se utilizó una cámara MP4 y películas T-55, de Polaroid, con iluminación inferior mediante transiluminador de 360 nm o 254 nm (Ultraviolet Products).

Para la exposición autorradiográfica de muestras marcadas se emplearon películas X-Omat S de Kodak. En exposiciones largas de muestras marcadas con ^{32}P se utilizaron pantallas amplificadoras Cronex Lightningplus de la casa Dupont. El revelador Microphen y el fijador ácido Fyval fueron de las firmas Ilford y Valca, respectivamente.

6. OTROS PRODUCTOS.

Los componentes de los medios de cultivo se obtuvieron de Probus, Merck y Difco, esta última firma suministró también el Na-DOC.

Los antibióticos Cm y Tc, el IPTG, el TEMED, el dimetil arsenato sódico, el DTT, la polivinilpirrolidona, el MOPS, el HEPES, el tRNA de *E.coli* y los DNAs de timo de ternera y de esperma de salmón fueron de la casa Sigma. La casa Boehringer suministró la ampicilina sódica, el PIPES, la ddTTP, y los NTPs y dNTPs no radiactivos.

Las agarosas, la acrilamida, la bisacrilamida, la resina Bio-Rex (20-50 mesh), el SDS, así como los geles de agarosa y heparina-agarosa fueron de Bio-Rad.

Pharmacia suministró: Ficoll, Sephadex G-50, DEAE-Sephacel y pd(N)_6 .

La hidracina y el β ME fueron de la casa Eastman-Kodak, el PSA fue de BRL.

De la casa Aldrich-Chemie se obtuvieron el sulfato ferroso amónico y el EDTA utilizados para la generación de radicales hidroxilos.

Merck suministró: EDTA, cloroformo, fenol, etanol, isopropanol, Tris, DMS, DMSO, peróxido de hidrógeno, TCA, formato de piridina, piperidina y formamida. Cuando se necesitó desionizar la formamida, se procedió como describen Maniatis y cols (1982).

La firma Schleicher & Schuell proporcionó los filtros de nitrocelulosa BA85 para la transferencia de Southern y el papel NA45 para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. Para esta purificación se empleó también el "GeneClean" de la casa BIO 101 Inc.

El material radiactivo fue suministrado por Amersham Internacional.

METODOS

1. CONSERVACION DE LAS ESTIRPES.

Todas las estirpes fueron conservadas a -70°C . Para el uso rutinario de las estirpes de pneumococos y de *E.coli*, se dispuso también de una colección a -30°C .

Antes de ser congelados, los cultivos de *S.pneumoniae* y *E.coli* fueron ajustados a 10% de glicerol y mantenidos a 37°C durante 10 minutos. La descongelación de los cultivos en estas dos especies se realizó a 4°C .

Los cultivos de *B.subtilis*, por su parte, se congelaron y descongelaron de forma rápida. La congelación se llevó a cabo en una mezcla de nieve carbónica y etanol, tras añadir a los cultivos DMSO al 5%. La descongelación se realizó por incubación en un baño de agua a 37°C .

2. CONDICIONES DE CULTIVO.

La temperatura de incubación fue de 37°C para todas las estirpes utilizadas.

Dado que *S.pneumoniae* es una bacteria microaerófila, el cultivo en medio líquido de las estirpes de pneumococos se realizó en tubos o matraces cuya capacidad no sobrepasara el doble del volumen del cultivo, y la incubación se realizó en baños termostatzados sin agitación.

Cuando las estirpes de *B.subtilis* y *E.coli* fueron cultivadas en medio líquido, la incubación se realizó con agitación y la capacidad de los matraces empleados fue al menos cinco veces mayor que el volumen del cultivo, para permitir una buena aireación.

El crecimiento de los cultivos en medio líquido se siguió, generalmente, midiendo su DO en un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20, a unas longitudes de onda de 550, 600 y 650 nm para *B.subtilis*, *E.coli* y *S.pneumoniae*, respectivamente. En ocasiones, el crecimiento fue medido también como variación en el número de u.f.c. Para ello, se tomaron muestras del cultivo líquido a distintos tiempos, se diluyeron adecuadamente y se inocularon en medio sólido, que fue incubado para permitir la formación de colonias. Es importante resaltar que en *S.pneumoniae* cada u.f.c. contiene una media de cuatro células (López y cols, 1989).

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas petri con los medios indicados

en Materiales para cada bacteria. Para *S.pneumoniae*, las células y, en su caso, el antibiótico(s) fueron incluidos en una primera capa que contenía 20 ml de medio con agar al 1%. Una vez solidificada la capa basal, se añadieron 8 ml de medio conteniendo agar al 0.75%. En el caso de *B.subtilis* y *E.coli*, el cultivo en medio sólido se realizó en superficie.

3. PUESTA EN COMPETENCIA Y TRANSFORMACION DE CELULAS BACTERIANAS.

3.1. *S.pneumoniae*.

Para las estirpes de *S.pneumoniae* se siguió el método descrito por Lacks (1966). Un cultivo crecido hasta una DO = 0.2 (1.5×10^8 u.f.c./ml) fue diluido cuarenta veces en medio AGCH suplementado con sacarosa al 0.2% y se permitió su crecimiento a 37°C hasta que alcanzó de nuevo una DO = 0.2, momento en el que podía ser congelado y conservado a -70°C. Previamente a la transformación, el cultivo fue diluido en una proporción 1:20 en AGCH conteniendo sacarosa al 0.2% y CaCl_2 al 0.001%. Tras una incubación de 20 min a 30°C se añadió el DNA y se continuó la incubación a la misma temperatura durante 40 min más. Para permitir la expresión fenotípica del marcador para el que se iban a seleccionar los transformantes, el cultivo fue incubado a 37°C durante 90 min. En el caso de selección para Cm^r , los últimos 20 min de expresión tuvieron lugar en presencia de 0.5 µg/ml del antibiótico, concentración subinhibitoria que induce la expresión del gen *cat* (cloramfenicol acetiltransferasa).

3.2. *B.subtilis*.

El método empleado dependió de la estirpe que se deseaba transformar.

B.subtilis MB11 fue puesta en competencia y transformada siguiendo el método descrito por Young y Wilson (1972). Una colonia aislada sobre medio sólido TY fue inoculada en 100 ml de medio GM1. El cultivo se creció durante 12 a 14 h a 30°C en condiciones de baja aireación (el recipiente empleado fue una probeta de 100 ml y no se empleó agitación), de forma que la DO al cabo de este tiempo no fuera superior a 0.1. El cultivo fue entonces transferido a un matraz de 2 l, en donde se incubó a 37°C con fuerte agitación (300 rpm) hasta 90 min después de que abandonara la fase

exponencial. Las células fueron recogidas por centrifugación a 10000 rpm en el rotor JA14 (Beckman), a 4°C, durante 10 min, y resuspendidas en 10 ml de sobrenadante. En este momento las células podían ser congeladas y conservadas a -70°C. Antes de la adición del DNA, los cultivos concentrados fueron diluidos 100 veces en medio GM2 e incubados a 37°C con fuerte agitación el tiempo necesario para alcanzar la máxima competencia, el cual hubo de ser calculado para cada lote de células competentes. Una vez añadido el DNA, los cultivos fueron incubados en las mismas condiciones durante 45 min. Para permitir la expresión fenotípica de los marcadores de selección, la incubación se prosiguió durante otros 45 min. Cuando se iban a seleccionar transformantes Cm^r, se indujo la expresión del gen *cat* en las condiciones descritas para *S.pneumoniae*.

Para localizar el pico de máxima competencia para cada lote de células, se realizó una transformación empleando como donador el DNA de una estirpe de *B.subtilis* protótrofa para metionina. Un μg de este DNA fue añadido a 1 ml de células competentes incubadas 60, 90 o 120 min en medio GM2 y el proceso se continuó como se describe en el párrafo anterior. Para determinar el número de transformantes, se extendieron diluciones apropiadas de los cultivos transformados en placas de medio sólido. El número total de viables fue también determinado sobre placas de este medio suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de metionina. Para cada tiempo se calculó la frecuencia de transformación definida como el porcentaje de células viables que han sido transformadas para dicho marcador, y se eligió el tiempo correspondiente a la máxima frecuencia.

Para la puesta en competencia y transformación de la estirpe **CU403** se utilizó el método anterior, ligeramente modificado. Así, 90 min después de abandonar la fase exponencial, el cultivo fue directamente diluido en una proporción 1:10 en el medio GM2. Tras 90 min de incubación, el cultivo fue centrifugado y concentrado 10 veces antes de la adición del DNA.

Por su parte, el método descrito por Joenje y cols (1973), fue el utilizado para poner competente y transformar la estirpe **MB63**. Una colonia fue inoculada en 50 ml de medio MBW suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de triptófano, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de timina y 3 mM de MgSO_4 . El cultivo se creció durante 12 h a 37°C en condiciones de fuerte aireación, siendo entonces diluido 7 veces con medio BWC que contenía triptófano a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La incubación se prosiguió en las mismas condiciones durante 3.5 horas, al cabo de las cuales el cultivo podía ser congelado y conservado a -70°C. Antes de añadir el DNA el cultivo se diluyó volumen a volumen con medio MBW suplementado con los requerimientos auxotróficos y se incubó a 37°C con fuerte agitación hasta que se alcanzó el pico de máxima competencia. Tras la adición del DNA se procedió como se ha descrito en los párrafos anteriores. El pico de máxima competencia se determinó para

cada nuevo lote de células de manera similar a la descrita para la estirpe MB11, pero utilizando como fuente de DNA transformante una estirpe protótrofa para triptófano. La determinación del número de transformantes para cada tiempo se realizó sobre placas de medio sólido. Este medio, suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de triptófano, se usó para determinar el número total de viables.

3.3. *E.coli*.

La transformación bacteriana de las distintas estirpes de *E.coli* se llevó a cabo mediante una modificación del método descrito por Kushner (1978).

Se inocularon 15 ml de medio LB con 0.1 ml de un cultivo en fase estacionaria, incubándose a 37°C con agitación fuerte (300 rpm) hasta que se alcanzó una DO = 0.5. Las células fueron recogidas por centrifugación de 10 min a 8000 rpm en el rotor JA20 (Beckman), a 4°C, y se resuspendieron en 7.5 ml de tampón A (MOPS 10 mM pH 7, KCl 10 mM). Tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones, el sedimento celular se resuspendió muy suavemente en 7.5 ml de tampón B (MOPS 100 mM pH 6.5, KCl 10 mM, CaCl_2 50 mM). La suspensión se incubó 30 min a 4°C y, tras centrifugar, las células fueron suavemente resuspendidas en 1.5 ml de tampón B, añadiéndose DMSO a una concentración final del 1.6%. A 0.2 ml de suspensión así tratada se le adicionaron 1-200 ng del DNA transformante. Las mezclas fueron mantenidas 30 min a 0°C antes de someter a las células a un choque térmico de 30 segundos a 43.5°C. A continuación se añadieron 1.3 ml de medio LB y se permitió la expresión fenotípica de los marcadores por incubación a 37°C durante 1 h, sin agitación. Cuando se trató del marcador para Cm^r , las células se mantuvieron en presencia de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Cm durante los últimos 20 min de expresión.

4. DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS PLASMIDICO.

4.1. Determinaciones densitométricas.

Este método, basado esencialmente en el descrito por Projan y cols (1983), se utilizó para determinar los números de copias relativos de diferentes plásmidos en un mismo huésped.

Se prepararon, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 7.1, extractos crudos de los cultivos cuyo contenido plasmídico se deseaba cuantificar. Las preparaciones fueron

cargadas en geles de agarosa al 1.2% y fueron sometidas a electroforesis en tampón TAE, a 2.5 V/cm durante 14 h. Los geles se tiñeron durante 30 min en el mismo tampón conteniendo 1 µg/ml de EtBr, y a continuación se mantuvieron sumergidos 1 h en agua destilada, con objeto de reducir la fluorescencia de fondo. De cada gel se realizaron varias fotografías a distintos tiempos de exposición, iluminando con luz ultravioleta de 254 nm. Los negativos fueron analizados por densitometría, como se describe en el apartado 13 de este mismo capítulo.

Dado que el grupo planar del EtBr se intercala en mayor grado en las formas lineales y OC del DNA que en su forma ccc, los valores densitométricos correspondientes a esta última forma debían ser multiplicados, para el cálculo del número de copias, por un factor de corrección que Projan y cols (1983) han estimado en 1.36. El número de moléculas de plásmido por equivalente cromosómico (n) fue calculado a partir de la ecuación:

$$n = \frac{(Dp_1 + 1.36 \times Dp_2) \times Mc}{Dc \times Mp}$$

donde :

Dp_1 es el valor determinado por densitometría para la banda correspondiente a las formas OC del plásmido.

Dp_2 es el valor determinado por densitometría para la banda correspondiente a las formas plasmídicas ccc.

Mc es el tamaño del DNA genómico, estimado en 3×10^6 pb para las tres especies bacterianas en estudio (Lacks y cols, 1986).

Dc es el valor determinado por densitometría para la banda correspondiente al DNA cromosómico.

Mp es el tamaño del DNA plasmídico en pb.

4.2. Marcaje de DNA total *in vivo*.

Se siguió el método descrito por Lacks y cols (1986). Las estirpes y medios básicos utilizados para el marcaje fueron:

- *S.pneumoniae* 560, en el medio AGCH suplementado con sacarosa al 0.2%.
- *B.subtilis* MB63, empleándose el medio BWC sin timina y suplementado con 50 µg/ml de triptófano.
- *E.coli* H560rev, en medio M9 suplementado con arginina y metionina a una concentración final de 50 µg/ml.

Estas estirpes (véase Tabla 1), conteniendo los plásmidos de interés, se crecieron durante 10 generaciones en los medios indicados, suplementados con la concentración adecuada del antibiótico correspondiente al marcador plasmídico y con [³H]-timidina (15 Ci/mmol) a una concentración final de 3 µM. A partir de dichos cultivos se prepararon extractos de DNA total, siguiendo el método descrito en el apartado 7.1. de este capítulo. Los extractos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, en las condiciones descritas en el apartado anterior. Tras teñir con EtBr los geles, se escindieron trozos de los mismos que contenían las bandas correspondientes al DNA cromosómico y a las distintas formas de DNA plasmídico. La agarosa de cada trozo de gel se disolvió en 1 ml de DMSO y, tras la adición de 10 ml de líquido de centelleo Ready-solv HP/b, se contó la radiactividad de las distintas bandas de DNA. El número de moléculas de plásmido por equivalente cromosómico (n) se calculó, a partir de los valores de radiactividad de tres experimentos independientes, usando la siguiente ecuación:

$$n = \frac{R_p \times M_c}{R_c \times M_p}$$

donde:

R_p es la suma de los valores de radiactividad de las distintas bandas de DNA plasmídico bicatenario.

R_c es el valor de radiactividad correspondiente al DNA cromosómico.

M_c es el tamaño del cromosoma (3×10^6 pb en las tres especies).

M_p es el tamaño del plásmido en pb.

Estas determinaciones del número de copias plasmídico se realizaron también

utilizando como huéspedes estirpes protótrofas para timidina. En estos casos la eficiencia del marcaje fue menor, pero los resultados fueron similares a los obtenidos con las estirpes auxótrofas.

En ninguno de los dos procedimientos para la determinación del número de copias plasmídico (densitometría o marcaje del DNA) se tuvo en cuenta la presencia de ssDNA, que a veces, sin embargo, representa una parte importante del DNA plasmídico total.

5. TESTS DE ESTABILIDAD.

Se prepararon cultivos de las estirpes que contenían los plásmidos en estudio en medio líquido selectivo, y se crecieron hasta una DO de 0.4, a la cual fueron considerados como cultivos de partida ($g=0$). A continuación, los cultivos fueron diluidos sucesivamente en una proporción 1:1023 en medio sin antibiótico, permitiéndose su crecimiento hasta alcanzar la DO de partida. De esta forma se mantuvo constantemente en 10 el número de generaciones transcurrido en cada dilución. Cada 10 generaciones se tomaron muestras de los cultivos, se diluyeron apropiadamente y se extendieron en placas de medio con y sin presión de selección para determinar el porcentaje de células con plásmido. Cuando los plásmidos eran muy inestables o su velocidad de pérdida se iba incrementando, se analizaron una a una las primeras generaciones. En estos casos, los cultivos diluidos a la mitad con medio no selectivo contendrían aún una concentración de antibiótico suficiente para seleccionar las células con plásmido, por lo que los cultivos de partida (en medio selectivo y crecidos a DO de 0.4) fueron centrifugados y las células se resuspendieron suavemente en un volumen igual al inicial de medio sin antibiótico. Esta suspensión fue considerada como $g=0$, y una muestra de la misma se analizó inmediatamente. Para cada generación, los cultivos se diluyeron en una proporción 1:1 con medio no selectivo y se crecieron hasta una DO de 0.4, a la cual se analizó el porcentaje de células con plásmido y se procedió a diluir nuevamente el cultivo.

La tasa experimental de pérdida del plásmido por célula y generación (L_{ex}) se calculó a partir de la ecuación:

$$L_{ex} = 1 - (P)^{1/n}$$

Siendo P la frecuencia de células viables que conservan el plásmido tras crecer el cultivo durante n generaciones en medio sin presión selectiva.

Dado que, en ocasiones, el cultivo en medio con presión selectiva (0 generaciones) presentaba ya una determinada proporción de células sin plásmido, el valor de la frecuencia de células con plásmido en un momento dado debía hacerse relativo al valor de esta frecuencia en el cultivo de partida, por lo que la ecuación utilizada fue:

$$L_{ex} = 1 - (P/P_o)^{1/n}$$

Donde P_o es la frecuencia inicial de células con plásmido (en el cultivo con presión de selección).

6. TESTS DE INCOMPATIBILIDAD.

Estos experimentos se han llevado a cabo utilizando como huésped la estirpe 708 de *S.pneumoniae* (Tabla 1). Se realizaron dos tipos de pruebas, cuyo desarrollo experimental fue similar al descrito por Nordström y cols (1980a, 1980b).

Test I. Se pusieron en competencia pneumococos que contenían el plásmido de interés, basado en el replicón pLS1. Las células fueron transformadas con un segundo plásmido, derivado de pC194, cuyo efecto sobre la estabilidad segregacional y número de copias del primero se deseaba analizar. Los transformantes fueron aislados en placas con Cm, dado que el plásmido donador confiere resistencia a este antibiótico. Después de permitir el crecimiento de las colonias hasta un tamaño medio, 12-24 de éstas fueron inoculadas en medio líquido conteniendo dicho antibiótico. Los cultivos se crecieron hasta una DO de 0.5 y se determinó el porcentaje de células resistentes a Tc (que aún conservan el replicón pLS1). Asimismo, se analizó el contenido total de DNA de dichos cultivos mediante la preparación de extractos crudos. Hemos estimado que son necesarias unas 25 generaciones para que una u.f.c. dé lugar a una colonia de tamaño medio. Este valor se ha deducido a partir del número medio total de u.f.c. presentes en estas colonias (30×10^5), determinado mediante recuento en placas. Por otra parte, son necesarias unas 12 generaciones para que la porción de colonia inoculada en el medio líquido (aproximadamente 4×10^5 u.f.c. en 4.5 ml de medio) dé lugar a un cultivo crecido hasta una DO de 0.5. Por todo ello, en este tipo de experimentos se evalúan los efectos de un plásmido donador sobre la segregación y número de copias de otro plásmido residente, tras 37 generaciones en ausencia de presión selectiva para este último.

Test II. En estos experimentos, un plásmido derivado de pLS1 fue transferido a células que contenían como residente un plásmido basado en el replicón pC194. Los transformantes fueron seleccionados indistintamente para Tc^r, marcador del plásmido donador, o para Tc^r y Cm^r. Las colonias se inocularon en medio líquido en el que se mantuvo la misma presión de selección. A partir de estos cultivos se prepararon extractos crudos para visualizar el efecto que ejerce la presencia del plásmido residente sobre el número de copias del replicón pLS1. A continuación los cultivos se diluyeron sucesivamente en medio sin presión de selección para el plásmido donador. Cada 10 generaciones se calculó el porcentaje de células que contienen el replicón pLS1 (resistentes a Tc) y se visualizó el contenido total de DNA, mediante la preparación de extractos crudos.

7. PREPARACIONES DE DNA.

7.1. Extractos crudos celulares.

Este fue el método elegido, por su sencillez y rapidez, para analizar el contenido plasmídico de las estirpes en estudio. Hay que tener en cuenta que el DNA cromosómico no es eliminado en este tipo de preparación. El método fue aplicado, con modificaciones, a los tres géneros con los que se trabajó.

Para *B.subtilis* y *E.coli*, las células de 10 ml de cultivo crecido hasta una OD de 0.4 fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en 100 μ l de solución de lisis (RNasa A 20 μ g/ml, lisozima 2 mg/ml, sacarosa 25%, NaCl 0.1 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). La mezcla fue incubada 10 min a 37°C.

Para *S.pneumoniae*, se centrifugaron 1.5 ml de cultivo crecido hasta una OD de 0.5. El sedimento celular se resuspendió en 100 μ l de solución de lisis (RNasa A 20 μ g/ml, sacarosa 25%, citrato trisódico 0.15 M, SDS 0.01%, Na-DOC 0.1%) y la mezcla se mantuvo 7 min a temperatura ambiente.

A continuación, y ya para los tres géneros, se añadieron 10 μ l de una solución de SDS al 10%. Los lisados celulares se agitaron vigorosamente durante 3 min y se sometieron a cuatro ciclos de congelación a -70°C y descongelación a 37°C, con el fin de disminuir su viscosidad por rotura del DNA cromosómico. Tras este proceso, se añadió proteinasa K a una concentración final de 170 μ g/ml y se dejó actuar a temperatura ambiente

durante 10 min. Se añadieron entonces 50 μ l del colorante de carga CEC(3x), con lo que los extractos crudos quedaron listos para ser sometidos a electroforesis.

7.2. Minipreparaciones plasmídicas.

Este método, basado en el descrito por Birboim y Doly (1979), consiste en la eliminación selectiva del DNA cromosómico mediante su desnaturalización alcalina y posterior precipitación. El procedimiento se describe a continuación:

Se recogieron, por centrifugación en microcentrífuga Eppendorf, las células de 1.5 ml de cultivo en fase estacionaria temprana. El sedimento celular fue resuspendido en 100 μ l de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0), conteniendo 2 mg/ml de lisozima (*B.subtilis* y *E.coli*) o 0.1% de Na-DOC (*S.pneumoniae*). Las mezclas fueron incubadas a 37°C durante 10 min. La lisis total y la desnaturalización del DNA cromosómico se obtuvieron por adición de 200 μ l de solución II, que contiene SDS al 1% y NaOH 0.2 N (*B.subtilis* y *E.coli*) o 0.17 N (*S.pneumoniae*). Tras mezclar suavemente, las preparaciones se mantuvieron 5 min a 0°C y a continuación se neutralizaron por adición de 150 μ l de solución III (acetato potásico 3 M, pH 4.8). Las mezclas se mantuvieron 60 min a 0°C, siendo a continuación centrifugadas durante 10 min en microcentrífuga. El sobrenadante (libre ya de DNA cromosómico y restos celulares) fue recogido y tratado con una mezcla de fenol:cloroformo, y el DNA plasmídico presente fue precipitado y procesado, todo ello como se describe en el apartado 8 de este capítulo, teniendo en cuenta que en la primera precipitación no es necesario añadir acetato sódico, ya que la concentración necesaria de catión monovalente ya es proporcionada, con creces, por el acetato potásico presente en la solución III. Las preparaciones de DNA, una vez disueltas en el volumen deseado de tampón TE(10:1), quedaron listas para ser sometidas a electroforesis o a cualquier otro tratamiento.

7.3. Preparación de plásmidos puros.

El método empleado para la preparación a gran escala de DNA plasmídico puro fue básicamente el mismo para *S.pneumoniae* y *E.coli*, diferenciándose sólo en el procedimiento de lisis celular.

Cultivos de 1 l fueron crecidos hasta alcanzar la fase estacionaria temprana. Las células se sedimentaron por centrifugación de 15 min a 8000 rpm, en el rotor JA10

(Beckman), a 4°C, y se resuspendieron en 200 ml de tampón TE(50:20) (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 20 mM), centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones.

Lisis celular para *E.coli*. El sedimento celular se resuspendió en 100 ml de tampón de lisis (lisozima 2 mg/ml, sacarosa 20%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0), incubándose 10 min a 37°C. A continuación se añadieron 80 ml de EDTA 0.25 M, y la mezcla se mantuvo en hielo durante 10 min. Una lisis clara se consiguió por adición de 100 ml de una solución de SDS al 15% en TE(10:1), e incubación a 37°C durante 10 min.

Lisis celular para *S.pneumoniae*. Las células fueron resuspendidas en 12 ml de EDTA 0.25 M, añadiéndose a continuación 40 ml de solución de lisis (sacarosa 25%, citrato trisódico 0.15 M, Na-DOC 0.1%, SDS 0.01%) e incubándose la mezcla 5 min a 37°C. Tras la adición de pronasa a una concentración final de 0.7 mg/ml, se prosiguió la incubación a 37°C durante otros 10 min, transcurridos los cuales se añadieron 124 ml de TE(10:1) y 24 ml de SDS 10%, y se continuó la incubación hasta observar lisis clara.

A los lisados claros así obtenidos, se les añadió NaCl hasta una concentración final de 1 M, manteniéndose a continuación de 12-16 h a 4°C. Los restos celulares y gran parte del DNA cromosómico fueron eliminados, como sedimento, por centrifugación a 12000 rpm en rotor JA14 (Beckman) durante 1 h a 4°C.

Los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante fueron precipitados, durante 7 h a 4°C, por adición de PEG-6000 a una concentración final del 10%.

El precipitado fue recogido por centrifugación a 7000 rpm en rotor JA14, 20 min, a 4°C, y resuspendido en 10 ml de TE(10:1), añadiéndose a continuación 10.5 g de CsCl, y EtBr a una concentración final de 0.5 mg/ml. La mezcla se transfirió a un tubo de ultracentrífuga Beckman tipo Quick-seal, siendo centrifugada 48 horas a 40000 rpm en el rotor Ti-65 de la ultracentrífuga Beckman (mod. L-80), a 18°C.

El DNA se visualizó por iluminación con una lámpara de luz ultravioleta de 360 nm. La banda de DNA plasmídico ccc fue extraída mediante punción lateral del tubo con una aguja acoplada a una jeringa de 1 ml.

El EtBr presente en la muestra se extrajo por adición de un volumen de isopropanol saturado con SSC(20x). Las dos fases fueron mezcladas y, tras permitir de nuevo su separación, se retiró la fase superior correspondiente al isopropanol. Este proceso se repitió hasta que la fase isopropanólica quedó totalmente incolora.

Con objeto de eliminar el CsCl, las muestras se dializaron en bolsas de diálisis, como se describe en el apartado 8 de este capítulo.

7.4. Valoración del DNA.

La valoración de la cantidad y grado de pureza del DNA presente en una muestra se realizó por espectrofotometría, midiendo la absorción de las muestras en un rango de longitudes de onda entre 230 y 330 nm en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-160.

El valor de la absorción a 258 nm permitió calcular la concentración de DNA presente en la muestra, ya que, a esta longitud de onda, una absorción = 1 corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$ de dsDNA.

Por su parte, la relación entre los valores de la absorción a 258 y 280 nm proporcionó una estimación de la pureza del DNA. En preparaciones aceptablemente puras, esta relación es cercana a 2. Si hay contaminación con proteínas o fenol, el valor de la relación disminuirá significativamente.

8. FENOLIZACION, PRECIPITACION Y DIALISIS DEL DNA.

En general, la desproteinización de las muestras de DNA se realizó por extracción con una mezcla 1:1 (v/v) de fenol y cloroformo, en donde fenol hace referencia a fenol equilibrado con TE(10:1) y conteniendo hidroxiquinoleína al 0.1% y β ME al 0.2%, y cloroformo se refiere a una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v). Las muestras se trataron con un volumen de fenol:cloroformo (1:1) y, tras 1 min de vigorosa agitación, se separaron las fases acuosa y orgánica por centrifugación durante 5 min en la microcentrífuga, recuperándose la fase superior acuosa que contiene el DNA. Cuando la cantidad de DNA presente en la muestra fue inferior a 5 μg , la fase orgánica fue reextraída con un volumen de TE(10:1).

Tras el tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina, y con el fin de asegurar la eliminación total de la actividad enzimática, las muestras fueron tratadas una vez con fenol, una vez con fenol:cloroformo y una vez con cloroformo. Cada uno de estos tratamientos se realizó como se ha descrito para el del fenol:cloroformo.

En todos los casos, después de la desproteinización, el DNA fue precipitado dos veces y lavado con etanol al 70%, como se describe a continuación.

Para precipitar el DNA presente en una muestra, a ésta se le añadieron 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M (ajustado a pH 7.0 con ácido acético) y a continuación, dos volúmenes de etanol absoluto o bien un volumen de isopropanol. Cuando la cantidad

de DNA a precipitar fue inferior a 4 μg , se añadieron 5 μg de tRNA, siempre y cuando el DNA no fuera a ser sometido posteriormente a ninguna reacción enzimática en la que el tRNA pudiera también servir de sustrato. La mezcla de precipitación se mantuvo a -70°C durante un mínimo de 30 min, o a -20°C durante 12 horas, siendo a continuación centrifugada a 12000 rpm en el rotor 12001 de la centrífuga Sigma 2MK, a -10°C . La duración de la centrifugación dependió de la concentración y tamaño del DNA presente en la muestra, variando entre 6 y 40 min. Para eliminar los restos de sales que pudieran quedar con el precipitado, éste se lavó cuidadosamente con etanol al 70%, realizándose, a continuación una centrifugación de 10 min en las mismas condiciones anteriores. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado se secó mediante un breve tratamiento bajo vacío, y se disolvió en el tampón deseado.

Para dializar muestras de DNA se utilizaron dos procedimientos, dependiendo del volumen de las mismas.

Cuando el volumen fue inferior a 50 μl , la diálisis se realizó en filtros VS de Millipore, los cuales fueron colocados en una placa petri conteniendo 30 ml del tampón deseado. La muestra a dializar se aplicó sobre el filtro y se permitió la diálisis a temperatura ambiente durante 40 min.

En el resto de los casos, la diálisis se llevó a cabo en bolsas, previamente hervidas en TE(10:1). El proceso se realizó a 4°C frente a volúmenes de tampón 1000 veces superiores al de la muestra de DNA, realizándose tres cambios de dicho tampón.

9. MANIPULACION ENZIMATICA DEL DNA.

9.1. Digestión con endonucleasas de restricción.

Este tipo de tratamiento del DNA se realizó, por lo general, en las condiciones de tampón, temperatura, unidades de enzima y tiempo de reacción recomendadas por la firma suministradora correspondiente.

Si el DNA digerido iba a ser utilizado posteriormente para otras manipulaciones enzimáticas, se procedió a fenolizar y precipitar las muestras, eliminando el exceso de sales de las mismas mediante dos lavados con etanol o por diálisis en filtro.

9.2. Eliminación de extensiones protuberantes.

La digestión de las extensiones monocatenarias en extremos protuberantes de fragmentos de DNA se realizó por tratamiento con la nucleasa S1 o con la nucleasa "mung-bean". Este tipo de tratamiento se efectuó para convertir extremos protuberantes de fragmentos de DNA en extremos romos, con el fin de poder ligar entre sí fragmentos con extremos en principio incompatibles. Ya que las nucleasas S1 y "mung-bean" tienen también actividad sobre el RNA, éste debe estar ausente de las muestras de DNA que van a ser tratadas con estas enzimas.

Tratamiento con nucleasa S1. Para la eliminación de extensiones protuberantes en fragmentos de restricción de DNA, 4 μ g de dichos fragmentos fueron tratados con 1 unidad de nucleasa S1. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 40 μ l del tampón apropiado (ZnSO₄ 1 mM, NaCl 200 mM, acetato sódico 30 mM pH 4.6), por incubación a 30°C durante 30 min. Tras la reacción, las muestras fueron fenolizadas y precipitadas como se describe en el apartado 8, antes de ser tratadas con la DNA ligasa de T4.

Tratamiento con nucleasa "mung-bean". Para este tratamiento se siguieron las indicaciones de la casa proveedora en lo referente a concentración del DNA, unidades del enzima, tampón, temperatura y tiempo de incubación. Finalizado el tratamiento, las muestras fueron procesadas como se describe en el párrafo anterior.

El tratamiento con "mung-bean" tiene la ventaja, sobre el tratamiento con nucleasa S1, de que no produce roturas de doble cadena en el DNA a partir de roturas en una sola hebra.

9.3. Relleno de extremos 3' recesivos mediante Pol IK.

Este tratamiento permitió la conversión de fragmentos de DNA con extremos 5' protuberantes incompatibles, en fragmentos con extremos romos, que ya podían ser ligados entre sí. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 μ l conteniendo, además del tampón apropiado, 1 μ g de DNA, 2.5 u del enzima y los 4 dNTPs, cada uno de ellos a una concentración final de 0.1 mM. Tras una incubación de 30 min a 20°C, el enzima fue inactivado por tratamiento a 70°C durante 10 min, y las muestras se procesaron como era habitual.

Cuando el objeto del tratamiento con este enzima fue el marcaje del DNA, se procedió como se detalla en el apartado 12.2.

9.4. Digestión con nucleasa BAL31.

El DNA plasmídico se linearizó con el enzima de restricción deseado y, previamente a la digestión con BAL31, la preparación de DNA se purificó mediante fenolización, precipitación con etanol y eliminación de los restos de sales.

Las condiciones de digestión con BAL31 (cantidad de enzima y tiempo de digestión) se calcularon previamente para cada experimento, en función del número de pares de bases de cada extremo del DNA que interesaba digerir. Las digestiones con nucleasa BAL31 descritas en este trabajo se realizaron en un volumen de 100 μ l que contenía el tampón especificado por la casa proveedora, 4 μ g de DNA, y 1 unidad del enzima. La mezcla de reacción se incubó a 30°C, y a distintos tiempos (entre 1 y 15 min) se fueron tomando alícuotas, a las que se les añadió EGTA a una concentración final de 40 mM para parar la reacción. Una parte de cada una de las alícuotas se sometió a electroforesis en gel de agarosa con el fin de analizar la extensión de la digestión por BAL31 a los distintos tiempos. Después de juntar las alícuotas en las que los fragmentos de DNA presentaban tamaños en el rango deseado, la mezcla fue fenolizada y el DNA precipitado. A continuación, el DNA digerido con BAL31 se trató con Pol IK y, seguidamente, con DNA ligasa.

9.5. Ligación de fragmentos de DNA.

En estos tratamientos se empleó la DNA ligasa del fago T4. La reacción se llevó a cabo a 18°C, durante un mínimo 4 horas.

Para ligar entre sí diferentes moléculas de DNA se mezclaron, generalmente, cantidades equimoleculares de las mismas en un volumen de 20 μ l conteniendo el tampón especificado por la firma comercial, entre 2 y 5 μ g de DNA, y 1 unidad de ligasa. Tras una primera reacción de ligación, la mezcla se diluyó 10 veces y se añadió otra unidad del enzima, con el fin de favorecer la recircularización de las moléculas antes de proceder a la transformación de los cultivos bacterianos.

Si los fragmentos que iban a ser ligados presentaban extremos cohesivos, las muestras se mantuvieron 10 min a 65°C antes de proceder a la reacción de ligación, con el fin de eliminar los apareamientos entre los extremos cohesivos de la misma molécula o de moléculas del mismo tipo.

Para la ligación de fragmentos de DNA con extremos romos, se añadió espermidina 1 mM a la mezcla de reacción y se incrementó al doble la cantidad de DNA ligasa.

9.6. Detección de sitios sensibles a nucleasa S1 en DNA superenrollado.

Para localizar los sitios sensibles a la nucleasa S1 sobre DNA superenrollado, se utilizaron las condiciones que se detallan a continuación:

El DNA superenrollado del plásmido pBR322, cuyos sitios sensibles a S1 han sido localizados (Lilley, 1980), se empleó para poner a punto las condiciones experimentales de estos ensayos en lo que respecta a las cantidades de enzima y sustrato y a los tiempos y temperaturas de incubación. Se vió así que, a temperaturas superiores a 39°C, se producía la degradación inespecífica de todo el DNA. Las condiciones escogidas fueron las que produjeron una mayor proporción de formas lineales frente a OC, puesto que en este tipo de experimentos sólo se pueden localizar los sitios en los que la nucleasa S1 produce roturas de doble cadena. Las reacciones contenían, en un volumen de 20 μ l, el tampón descrito en el apartado 9.2, 1 μ g de ccc DNA y 1 unidad del enzima, y fueron incubadas, bien a 37°C durante 5 horas, bien a 10°C durante 12 horas. Tras la incubación, las muestras fueron fenolizadas y el DNA precipitado y lavado. Con el fin de posicionar los sitios sensibles a S1 con respecto a los sitios de corte por endonucleasas de restricción, las muestras tratadas con S1 fueron digeridas, a continuación, con enzimas de restricción para las cuales el DNA en cuestión presentara uno o pocos sitios de reconocimiento, y los fragmentos resultantes fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

10. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS.

10.1. Electroforesis en geles de agarosa.

Se utilizaron geles horizontales de agarosa a una concentración variable entre el 0.8% y el 1.5%. La agarosa se disolvió, por calentamiento, en tampón de electroforesis TAE o TBE, y la solución se enfrió a 50°C antes de ser vertida sobre la cubeta de electroforesis. Antes de ser cargadas, las muestras se ajustaron a una concentración 1x de colorante de carga SBE, BXGE o CEC. La electroforesis se realizó a voltaje constante. Las dimensiones y porcentaje de agarosa de los geles, así como las condiciones de voltaje y duración de la electroforesis, se variaron según las características del ácido nucleico a analizar. Tras la electroforesis, el DNA o RNA de los geles se tiñó por inmersión de los mismos en el tampón utilizado para la electroforesis, al que se añadió 1 μ g/ml de EtBr y se mantuvo con suave agitación durante 20 ó 30 min. Cuando se requirió una

rápida observación de los ácidos nucleicos, o cuando debía seguirse la migración de los mismos durante la electroforesis, ésta se realizó en presencia de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr, que fue incluido tanto en el gel como en el tampón de electroforesis. Los ácidos nucleicos se visualizaron mediante luz ultravioleta en un transiluminador de onda larga (360 nm).

10.2. Electroforesis en geles de PAA (PAGE).

Para la resolución de fragmentos de DNA de 50 a 500 pb se utilizaron geles verticales de acrilamida al 5%, bisacrilamida al 0.13%, en tampón TAE conteniendo, además, TEMED al 0.05% y PSA al 0.12%. Las dimensiones de los geles fueron: 14.5 cm de ancho, 14 cm de largo y 1.2 mm de espesor. Las muestras se prepararon como se indica en el apartado anterior. La electroforesis se realizó a 100 V, y, una vez finalizada, el DNA fue teñido como se describe en 10.1.

10.3. Electroforesis en geles de secuenciación.

Estos geles desnaturalizantes de PAA se utilizaron para la resolución de los productos de las reacciones de secuenciación, para la determinación del tamaño de los fragmentos protegidos de la degradación por nucleasa S1, para el análisis de los productos de la transcripción *in vitro* y para la determinación de las regiones de DNA protegidas por RepA frente a la acción de la DNasa I o del radical hidroxilo.

Los geles (40 cm de largo, 36 cm de ancho y 0.35 mm de espesor) fueron sometidos a preelectroforesis durante una hora antes de cargar las muestras. Estas fueron resuspendidas directamente en el colorante de carga BXF, cuando se trataba de muestras de DNA, o en el colorante especificado en el apartado 28 de este capítulo, en el caso de tratarse de RNA. Las muestras, tras ser desnaturalizadas por calentamiento a 95°C durante 5 min, fueron enfriadas rápidamente en hielo para evitar la renaturalización de los ácidos nucleicos. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 1900 V. En todos los casos, estos geles contenían urea 8 M y PSA al 0.06% en tampón TBE más o menos concentrado. Las concentraciones de acrilamida, bisacrilamida, TEMED, tampón TBE, así como el tiempo de electroforesis, dependieron del tamaño de los fragmentos a analizar:

- Para resolver fragmentos de 1 a 30 bases, los geles contenían una concentración del 20% de acrilamida:bisacrilamida (38:1.3). La proporción de TEMED fue de 0.02%. El tampón TBE se usó 0.5x. Las muestras se corrieron hasta que el azul de bromofenol hubo

migrado 12 cm.

- Los fragmentos en el rango de 24 a 100 bases se analizaron en geles que contenían una concentración del 8% de acrilamida:bisacrilamida (38:2). La concentración de TEMED fue de 0.05%. El tampón de electroforesis fue TBE(1x). La electroforesis se interrumpió cuando el azul de bromofenol llegó al borde del gel.

- Para analizar los fragmentos de 100 a 300 bases de longitud, se emplearon geles con una concentración del 6% de acrilamida:bisacrilamida (38:2). El TEMED se empleó al 0.05% y el tampón TBE se usó 0.6x. La electroforesis se interrumpió cuando el xilencianol hubo recorrido la longitud total del gel, quedando en este caso los fragmentos de aproximadamente 104 bases en el borde inferior del gel. Cuando interesaron carreras más largas se tuvo en cuenta que, en estas condiciones de electroforesis, cada minuto transcurrido aumenta aproximadamente en una base el tamaño del fragmento que queda a borde del gel.

10.4. Electroforesis en geles para la separación de cadenas.

Para separar las dos cadenas de un fragmento de DNA cuando ambas eran exactamente del mismo tamaño, se utilizaron geles de PAA no desnaturalizantes que permitieran el apareamiento intracatenario de bases, fenómeno en el que parece estar basada la separación (Maniatis y cols, 1982).

Se emplearon geles de 40 cm de largo, 32.5 cm de ancho y 2 mm de espesor. Los pocillos sobre los que se aplicó la muestra tenían 1.5 cm de anchura, con el fin de mantener la concentración de la muestra tan baja como fuera posible para minimizar la renaturalización de las dos cadenas. Los geles contenían 8% de acrilamida:bisacrilamida (30:0.6), TEMED al 0.04% y PSA al 0.1% en tampón TBE(0.5x). Antes de cargar las muestras se realizó una preelectroforesis de 1 hora a 200 V.

Las muestras se ajustaron a 30% de DMSO, 1 mM de EDTA, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de xilencianol. Las soluciones se calentaron a 92°C durante 5 min y se enfriaron rápidamente en agua-hielo. Inmediatamente se procedió a cargar el gel y a efectuar la electroforesis a 200 V hasta que el xilencianol hubo recorrido las 3/4 partes de la longitud total. Las cadenas separadas se recuperaron del gel como se describe en el apartado 11.3.

11. EXTRACCION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES.

11.1. Utilización de membranas de DEAE-celulosa.

Se emplearon las membranas NA45 de DEAE-celulosa. El DNA se tiñó durante la electroforesis para poder seguir visualmente la separación del fragmento(s) de interés. Una vez que se dió por terminada la electroforesis, se realizó una incisión en la agarosa, por delante de la banda correspondiente al fragmento que se deseaba purificar, y en ella se introdujo la membrana NA45. Se continuó, entonces, la electroforesis hasta que todo el DNA hubo penetrado en la membrana. Esta se lavó en un tampón de baja sal (NaCl 0.15 M, EDTA 0.1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0) y el DNA se eluyó, a continuación, en uno de alta concentración de sal (NaCl 1 M, EDTA 0.1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0) por calentamiento a 65°C durante 1 hora. El DNA eluido se precipitó y se lavó dos veces.

11.2. Utilización de "GeneClean".

Se emplearon una serie de productos y soluciones comercializados por BIO 101 Inc. con el nombre de "GeneClean". Este incluye:

- a) Una solución saturada de NaI.
- b) Una solución concentrada de NaCl, Tris y EDTA, a partir de la cual se preparó la solución de lavado "New" por adición de agua destilada y etanol absoluto.
- c) Una suspensión de matriz de sílice en agua, denominada "Glassmilk".

Los geles se corrieron, como en el apartado anterior, en presencia de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr, utilizando TAE como tampón de electroforesis. Cuando las bandas de DNA estuvieron bien separadas, se escindió un trozo de gel conteniendo la banda deseada y se determinó su peso. Se añadieron 2.5 ml de la solución de NaI por cada g de peso del gel escindido y, tras agitar brevemente, la mezcla se incubó a 51°C hasta que la agarosa quedó disuelta. A continuación se añadieron 5 μl de "Glassmilk" a soluciones que contenían 5 μg o menos de DNA, añadiéndose 1 μl más de la suspensión por cada 0.5 μg de DNA por encima de 5 μg . La mezcla se agitó y se mantuvo en hielo durante 5 min para permitir la unión del DNA a la matriz de sílice y fue entonces centrifugada durante 20 segundos en la microcentrífuga. El sedimento correspondiente al DNA unido a la matriz fue recuperado y resuspendido en 400 μl de solución de lavado "New", tras lo cual volvió a ser sedimentado por centrifugación. Este proceso de lavado se repitió tres veces,

eliminándose mediante un microcapilar los restos de "New" que quedaron tras la centrifugación del último lavado. Para eluir el DNA de la matriz de sílice, el sedimento se resuspendió en un volumen de agua destilada igual o mayor que el volumen de "Glassmilk" inicialmente añadido y se incubó 5 min a 51°C. Tras una centrifugación de 2 min se recuperó el sobrenadante conteniendo el DNA. Esta elución se repitió de nuevo para incrementar el porcentaje de recuperación y se juntaron ambos sobrenadantes. Las muestras, en este punto, quedaron listas para ser sometidas a reacciones enzimáticas o cualquier otra manipulación.

11.3. Elución a partir de PAA.

Un trozo de gel de 0.1 a 0.2 cm³ que contenía el DNA a eluir fue escindido, troceado y sumergido en 4 ml de un tampón que contenía NaCl 0.2 M, EDTA 2 mM y Tris-HCl 20 mM pH 7.4, en donde se incubó a 42°C durante 16 horas. Los restos de acrilamida fueron eliminados pasando las muestras a través de una columna de lana de vidrio contenida en una pipeta pasteur. El DNA fue precipitado y lavado dos veces con etanol.

12. MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA.

12.1. Marcaje en 5' con polinucleótido quinasa.

Para este tipo de marcaje se requirió la eliminación previa de los fosfatos en posición 5' terminal de los fragmentos de DNA, tratamiento que se realizó mediante la fosfatasa alcalina.

Tratamiento con fosfatasa alcalina:

Se utilizó la fosfatasa alcalina de ternera. Ya que el RNA es también sustrato de este enzima, un tratamiento eficaz de las muestras requiere la ausencia de cualquier otro ácido nucleico contaminante.

El DNA (5 a 10 µg) digerido con el enzima de restricción deseado fue tratado con fenol:cloroformo, precipitado y lavado, siendo a continuación disuelto en 50 µl de tampón TE(10:1). Tras la adición de 2.2 µl de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 0.2 u del enzima, las mezclas de reacción fueron incubadas 60 min a 37°C (para defosforilar extremos 5'

protuberantes), o 30 min a 37°C y otros 30 min a 60°C (si se trataba de extremos romos). Finalizada la reacción, la fosfatasa alcalina fue extraída por tratamiento de las muestras con fenol, fenol:cloroformo y cloroformo. El DNA se precipitó y lavó dos veces.

Tratamiento con polinucleótido quinasa:

El DNA fue disuelto en 18 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, y se añadieron 5 μ l del tampón (10x) recomendado por la casa suministradora, 200 μ Ci de γ -[32 P]-ATP de una actividad específica de 3000 Ci/mmol, y 16 u de polinucleótido quinasa. La reacción se llevó a cabo durante 60 min a 37°C, realizándose a continuación una extracción con fenol:cloroformo y dos precipitaciones seguidas de lavado con etanol.

12.2. Marcaje en 3' con Pol IK.

Se emplearon como sustratos fragmentos de DNA con extremos 5' protuberantes, para los que este tipo de marcaje es más efectivo. El DNA digerido con un enzima de restricción que genere este tipo de extremos fue tratado con fenol:cloroformo y procesado como de costumbre.

La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 35 μ l, el tampón adecuado, entre 5 y 10 μ g de DNA, de 40 a 80 μ Ci del α -[32 P]-dNTP (actividad específica de 3000 Ci/mmol) que se deseaba incorporar, y 6 u del enzima. La reacción se llevó a cabo a 20°C durante 15 min, transcurridos los cuales se añadieron 2.5 nmoles de cada uno de los cuatro dNTPs fríos y se continuó la incubación durante 5 minutos más. Esto permite que los extremos 3' recesivos se rellenen completamente, con lo que todas las moléculas de DNA tendrán el mismo tamaño. A continuación se llevó a cabo una extracción con fenol:cloroformo, seguida de dos precipitaciones y lavado con etanol.

12.3. Marcaje de DNA al azar por el método de extensión de cebadores.

Se utilizó el método descrito por Feinberg y Vogelstein (1983).

El DNA molde se desnaturalizó, previamente, por calentamiento a 95°C durante 10 min, realizándose a continuación un enfriamiento rápido. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, en presencia de 0.2 μ g del DNA molde desnaturalizado, 0.1 M de HEPES pH 6.6, 2.5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de β ME, 50 μ Ci de α -[32 P]-dCTP (actividad específica de 3000 Ci/mmol), 10 μ M de cada uno de los restantes dNTPs fríos,

2.2 μg de cebadores pd(N)_6 y 5 u de Pol IK. La mezcla se incubó a 16°C durante 2 horas, al cabo de las cuales la reacción se paró por adición de 0.2 M de EDTA.

Después de realizar cualquiera de estos métodos de marcaje, el isótopo radiactivo no incorporado al DNA se eliminó por cromatografía de filtración a través de Sephadex G-50. Para ello se usaron jeringas de 1 ml que se llenaron con Sephadex G-50 equilibrado en TE(10:1). Las columnas se empaquetaron por centrifugación a 2000 rpm durante 4 min en rotor basculante. A continuación se aplicaron sobre la columna 200 μl de TE(10:1), y se centrifugó en las mismas condiciones. Este lavado se repitió una vez más antes de aplicar la muestra (en un volumen de 200 μl) sobre la columna y volver a centrifugar exactamente en las mismas condiciones. El volumen eluido (200 μl) contenía el DNA libre ya de nucleótidos no incorporados. La prueba se congeló a -20°C .

13. DENSITOMETRIA.

La densitometría de las bandas de proteína o de DNA, marcadas o teñidas, se realizó utilizando el densitómetro LKB Ultrosan 2202 acoplado a un computador Apple II.

14. SECUENCIACION DE DNA POR EL METODO DE DEGRADACION QUIMICA.

El método utilizado se basó en el descrito por Maxam y Gilbert (1980).

El DNA se marcó radiactivamente en sus extremos 5' o 3'. La marca de uno de los extremos del fragmento de interés fue eliminada mediante digestión con un segundo enzima de restricción, y el fragmento resultante que se deseaba secuenciar se purificó como se describe en el apartado 11.3.

El DNA (aproximadamente 10^6 cpm Cerenkov) fue disuelto en 30 μl de una solución de 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA de timo de ternera sonificado. A continuación, alícuotas de esta muestra se procesaron mediante diferentes tratamientos químicos, para los cuales se prepararon las siguientes mezclas de reacción:

Reacción A+G.

- 15 μ l de agua
- 5 μ l de muestra
- 2 μ l de formato de piridina 1M pH 2.0 (ácido fórmico al 4%, ajustado a pH 2.0 con piridina)

La reacción se llevó a cabo a 20°C durante 50 min, y se paró por adición de 10 μ g de DNA de timo sonicado, y congelación de la mezcla a -80°C. A continuación, las muestras fueron liofilizadas 3 veces.

Reacción A+C.

- 5 μ l de muestra
- 100 μ l de una solución 1.2 N de NaOH y 1 mM de EDTA

La reacción se efectuó a 90°C durante 9 min y se paró por adición de 150 μ l de ácido acético 1 N, 10 μ g de DNA de timo sonicado y 800 μ l de etanol absoluto, seguida de congelación a -80°C. Después de 5 min a dicha temperatura, la mezcla se centrifugó en la microcentrífuga, y el precipitado sedimentado se lavó con etanol al 70%. Los restos de sobrenadante se eliminaron mediante capilares estirados, y las muestras se desecaron bajo vacío.

Reacción G.

- 200 μ l de una solución compuesta por cacodilato sódico (dimetil arsenato sódico) 50 mM pH 8.0, $MgCl_2$ 10 mM y EDTA 1 mM.
- 5 μ l de la muestra
- 1 μ l de DMS

La reacción se llevó a cabo durante 3.5 min a 20°C y fue parada por adición de 50 μ l de tampón de parada (acetato sódico 1.5 M pH 6.0, β ME 70 mM, tRNA 100 μ g/ml y DNA de timo sonicado 200 μ g/ml) y 800 μ l de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo 5 min a -80°C y fue centrifugada. El sedimento fue resuspendido y precipitado dos veces más. Tras la última centrifugación, los restos de sobrenadante se eliminaron mediante microcapilares estirados y las muestras se secaron bajo vacío.

Reacción C+T.

- 19.5 μ l de agua
- 7.5 μ l de muestra
- 30 μ l de hidracina

La reacción se efectuó a 20°C durante 7 min y fue parada por la adición simultánea de 800 μ l de etanol absoluto y 200 μ l de tampón de parada compuesto por 0.3 M de acetato sódico pH 6.0, 0.1 mM de EDTA, 25 μ g/ml de tRNA y 50 μ g/ml de DNA de timo sonificado. Las muestras se procesaron como en el caso anterior.

Reacción C.

- 20 μ l de NaCl
- 2 μ l de agua
- 5 μ l de muestra
- 30 μ l de hidracina

La reacción se efectuó y paró como en la reacción C+T y las muestras se procesaron de igual modo.

Una vez finalizadas todas las reacciones se efectuó el tratamiento con piperidina. Para ello, las muestras se disolvieron en 100 μ l de piperidina 1 M y se mantuvieron 30 min a 92°C. Las muestras fueron liofilizadas 3 veces para eliminar la piperidina presente y a continuación fueron redisueltas en el volumen apropiado de colorante de carga BXF(1x) para tener aproximadamente 10^4 cpm(Cerenkov)/ μ l. El volumen de muestra aplicado a cada pocillo fue de 3 a 6 μ l, realizándose la electroforesis como se describe en 10.3. A continuación, películas X-Omat S de Kodak se expusieron, a -70°C durante 24-48 horas, a los geles sin secar, utilizándose pantallas amplificadoras.

15. DETECCION DE FORMAS PLASMIDICAS MONOCATENARIAS.

Se siguió el método descrito por te Riele y cols (1986b). Las estirpes utilizadas como huéspedes para el análisis de las formas plasmídicas monocatenarias fueron:

S.pneumoniae 708, *B.subtilis* MB11 y *E.coli* C600.

Se procedió, primeramente, a obtener extractos crudos de las células que contenían los plásmidos en estudio. Estos extractos fueron preparados, generalmente, como se describe en el apartado 7.1. Sin embargo, cuando las muestras iban a ser tratadas con nucleasa S1 se siguió un protocolo ligeramente modificado:

Para *S.pneumoniae*, tras la incubación en la solución de lisis, las muestras, que ya presentaban un aspecto de lisis clara, fueron agitadas durante 3 min y a continuación congeladas (-80°C) y descongeladas (37°C) dos veces. Los lisados fueron ajustados a 200 mM de NaCl, 1 mM de ZnSO₄ y 30 mM de acetato sódico pH 4.6 y la mitad de cada muestra (50 µl) fue separada y tratada con 200 u de nucleasa S1. Todas las muestras (tanto tratadas como no tratadas con S1) fueron incubadas 15 min a 37°C, y a continuación enfriadas en hielo. Tras la adición de SDS a una concentración final del 1%, se realizó un nuevo ciclo de congelación-descongelación. A partir de este punto se siguió el procesamiento general.

En el caso de *B.subtilis* y *E.coli*, la lisis clara de las muestras requirió la adición de SDS al 0.3% una vez finalizada la incubación en la solución de lisis. El tratamiento fue, por lo demás, idéntico al descrito en el párrafo anterior.

Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa de 20 cm de longitud, utilizándose como tampón TBE conteniendo 0.6 µg/ml de EtBr. La electroforesis se llevó a cabo a 40 V hasta que el azul de bromofenol hubo recorrido la longitud total del gel. Después de tomar una fotografía para posicionar las distintas bandas de DNA, el gel fue irradiado con luz ultravioleta durante 7 segundos, utilizándose un transiluminador de onda corta (Spectroline 254 nm). A continuación se realizó la transferencia de Southern.

Transferencia de Southern.

El método utilizado se basó en el descrito por Southern (1975). Dependiendo de la finalidad del experimento, el DNA de los geles fue o no desnaturalizado previamente a su transferencia a filtros de nitrocelulosa.

Tratamiento de desnaturalización del DNA. Con este tratamiento se consigue la transferencia posterior tanto del ssDNA como del dsDNA presentes en el gel.

Previo al tratamiento de desnaturalización, el DNA fue parcialmente hidrolizado por

inmersión de los geles en HCl 0.12 M, durante 15 min. Este tratamiento favorece la transferencia de dsDNA de gran tamaño. Los geles fueron a continuación lavados dos veces con agua destilada. Para la desnaturalización, los geles se mantuvieron 40 min sumergidos en la solución Soak I (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) y, tras dos nuevos lavados con agua destilada, fueron sumergidos en la solución de neutralización Soak II (NaCl 3 M, Tris-HCl 0.5 M pH 7.2) durante otros 40 min. Todos estos tratamientos se realizaron a temperatura ambiente.

Tratamiento sin desnaturalización. Solamente el ssDNA será posteriormente transferido. Los geles fueron sumergidos durante 40 min en Soak II.

A continuación, el gel se colocó sobre dos hojas de papel Whatman 3MM cuyos bordes estaban en contacto con una solución 10 veces concentrada de SSC. Sobre el gel se colocó el filtro de nitrocelulosa, previamente sumergido en dicha solución, y sobre el filtro se dispusieron, a su vez, tres hojas de papel Whatman 3MM secas y una pila de aproximadamente 10 cm de altura de servilletas de papel. Encima de este montaje se colocó un cristal que soportaba un peso de aproximadamente 1 kg, con el fin de evitar la formación de burbujas y favorecer el contacto entre las distintas capas de papel. La transferencia del DNA se permitió durante 12 horas, al cabo de las cuales el filtro de nitrocelulosa fue secado a 37°C y mantenido durante 2 horas a 85°C.

El DNA transferido al filtro se sometió a una prehibridación de 2 horas en un tampón consistente en formamida 50%, EDTA 5 mM, NaCl 0.9 M, fosfato sódico 48 mM pH 6.8, SDS 0.1%, DNA de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml y solución Denhart's 1x (preparada según describen Maniatis y cols, 1982). Para la hibridación, se añadió a este tampón el DNA sonda marcado radiactivamente, que fue previamente desnaturalizado por calentamiento a 95°C durante 10 min. Tanto la prehibridación como la hibridación se realizaron en cajas de plástico que contenían el volumen de tampón suficiente para cubrir el filtro, llevándose a cabo a 37°C con agitación suave. Tras 12 horas de hibridación, los filtros fueron lavados dos veces (10 min cada vez) con el tampón de lavado I (formamida 50%, EDTA 2 mM, fosfato sódico 20 mM pH 6.8, NaCl 0.36 M, SDS 0.1%) y otras dos veces (15 min cada vez) con tampón de lavado II (EDTA 0.1 mM, fosfato sódico 1 mM pH 6.8, NaCl 18 mM, SDS 0.1%). A continuación fueron secados durante 30 min a 37°C sobre papel Whatman 3MM. La exposición de la película al filtro fue de 4 a 48 horas a -70°C.

16. REPLICACION IN VITRO DE DNA DE PLASMIDOS.

Preparación de extractos libres de células (S30).

Se siguió el método descrito por Staudenbauer (1976), empleándose la estirpe C600 de *E.coli*, ya fuera sin plásmido endógeno o conteniendo los plásmidos de interés.

Dos litros de medio LBR se inocularon con 20 ml del cultivo correspondiente, crecido durante la noche. El nuevo cultivo se creció a 37°C con agitación, y cuando alcanzó una DO de 0.5 se ajustó el pH del medio a 8.0 con KOH 5 M. La incubación se continuó hasta alcanzarse la DO óptima para la preparación de extractos de replicación. Esta DO, así como el correspondiente peso húmedo de las células, se determinó experimentalmente para cada uno de los plásmidos cuya replicación se ensayó. En este punto, el crecimiento de los cultivos se paró por enfriamiento a 0°C y las células fueron recogidas por centrifugación a 8000 rpm, durante 10 min, a 0°C, en el rotor JA10 (Beckman). El sedimento celular se resuspendió en 30 ml de tampón-2 (HEPES-KOH 25 mM pH 8.0, KCl 100 mM, DTT 1 mM, *p*-aminobenzamidina 1 mM) preparado con agua bidestilada y enfriado a 0°C. La suspensión se trasvasó a tubos de centrífuga previamente pesados y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, a 0°C, en el rotor JA20 (Beckman). Después de eliminar todo el sobrenadante, se determinó el peso húmedo de las células sedimentadas. Estas se resuspendieron en tampón-2, en una proporción de 1 ml del tampón por cada gramo de células. El volumen final de la suspensión se midió y se transfirió a un tubo de policarbonato del rotor Ti65 (Beckman), siendo inmediatamente congelado en nitrógeno líquido. Tras proceder a la descongelación a 10°C, se añadió 1/50 de volumen de una solución recién preparada de lisozima (15 mg/ml en EDTA 50 mM pH 8.0), se mezcló bien y se mantuvo a 0°C durante 30 min. La mezcla fue nuevamente congelada y descongelada en las mismas condiciones. En este punto, las células estaban normalmente lisadas y la mezcla presentaba un aspecto viscoso. Cuando no fue así, se repitió la etapa de congelación-descongelación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 30000 rpm, durante 30 min, a 0°C, en el rotor Ti65. El sobrenadante se repartió en alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf perforados en la tapa. Los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C. Cada alícuota se descongeló una sola vez para evitar la inactivación del extracto por sucesivos ciclos de congelación-descongelación. Una muestra de cada nueva preparación de extractos se utilizó para determinar la concentración de proteínas presentes en los mismos, mediante el empleo del reactivo BCA (apartado 24.1 de este capítulo).

Ensayos de replicación *in vitro*.

Preparación y conservación de las soluciones :

Todas las soluciones y mezclas fueron preparadas empleando agua bidestilada. Salvo que se indique otra cosa, las soluciones se repartieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C.

dNTPs y NTPs: Se prepararon las siguientes soluciones: ATP (100 mM); CTP, GTP y UTP (40 mM) separadamente; también por separado, dATP, dCTP, dGTP y dTTP (10 mM). Los productos se disolvieron en HEPES-KOH 25 mM pH 8.0, y se llevó el pH a 7-8 con Tris-base 1 M.

Creatinquinasa 10 mg/ml en HEPES-KOH 25 mM pH 8.0, KCl 100 mM.

Creatina-fosfato 0.5 M en HEPES-KOH 25 mM pH 8.0.

NAD 10 mM preparado en HEPES-KOH 25 mM pH 8.0. El pH se llevó a 7-8 con Tris-base 1 M

cAMP 10 mM en HEPES-KOH 25 mM pH 8.0. La solución se llevó a pH 7-8 como en los casos anteriores.

Estas soluciones se emplearon para preparar las siguientes mezclas.

Mezcla de dNTPs: 400 μ l de HEPES-KOH 0.5 M pH 8.0, 110 μ l de acetato magnésico 1 M, 25 μ l de cada una de las cuatro soluciones de dNTPs 10 mM, 25 μ l de NAD 10 mM, 25 μ l de cAMP 10 mM y 40 μ l de agua bidestilada.

Mezcla de energía: 200 μ l de ATP 100 mM, 300 μ l de creatina-fosfato 0.5 M y 100 μ l de creatinquinasa 10 mg/ml.

Mezcla de NTPs: 100 μ l de cada una de las soluciones de CTP, GTP y UTP 40 mM.

Otras soluciones:

ddTTP. Se prepararon soluciones de distinta concentración (100 μ M, 300 μ M, 1 mM y 3 mM) en HEPES-KOH 25 mM pH 8.0, y se ajustó el pH a 7-8 con Tris-base 1M.

Soluciones de Antibióticos. Se prepararon soluciones en DMSO a una concentración 400 veces mayor que la usada en el ensayo. Las soluciones preparadas fueron: Nov a 10 mg/ml, Cm a 40 mg/ml y Rif a 10 mg/ml.

PEG 6000 al 25% en tampón-2. La solución se esterilizó por filtración a través de filtros Millipore de 0.45 μm y se almacenó a 4°C.

DNA plasmídico. Fue purificado como se describe en el apartado 7.3 de este capítulo y se conservó a -80°C, a una concentración de 1 mg/ml, en HEPES-KOH 25 mM pH 8.0, KCl 25 mM y EDTA 1 mM.

Inmediatamente antes de comenzar los ensayos de replicación se preparó el siguiente cóctel (para 20 ensayos): 35 μl de la mezcla de dNTPs, 30 μl de la mezcla de energía, 15 μl de la mezcla de NTPs y 20 μl de [^3H]-dTTP (1 mCi/ml, 43 Ci/mmol).

La mezcla de reacción se preparó en tubos Eppendorf previamente enfriados, añadiendo en este orden: el volumen de tampón-2 necesario para llevar el volumen final a 25 μl , la cantidad deseada de DNA plasmídico (1 μg , si no se especifica otra cosa), el volumen óptimo de extracto (correspondiente, en general, a unos 375 μg de proteína), 2.5 μl de PEG al 25% y 5 μl del cóctel radiactivo. Cuando se deseó probar el efecto de algún antibiótico sobre la replicación, éste se diluyó primero 40 veces en tampón-2, y se añadieron 2.5 μl de la dilución a la mezcla de tampón-2 y DNA. Tras la adición del extracto y del PEG, se realizó una incubación de 5 min a 30°C con el fin de permitir la acción del antibiótico antes de que el cóctel fuera añadido. Para el tratamiento con DNasa I, 1 μg de DNA se digirió, en un volumen final de 5 μl , con 2 u del enzima (40 u/ μg) en presencia de Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y MgCl_2 5 mM. La mezcla se incubó 5 min a 30°C, y a continuación se calentó a 70°C durante 10 min para inactivar el enzima. El DNA así tratado se añadió a las mezclas de reacción.

La concentración final de los componentes de la reacción fue: HEPES-KOH pH 8.0 50 mM; KCl 100 mM; acetato magnésico 11 mM; creatinquinasa 0.1 mg/ml; creatinafosfato 15 mM; PEG-6000 2.5 %; ATP 2 mM; CTP, GTP y UTP 0.4 mM; NAD, cAMP, dATP, dCTP, dGTP y [^3H]-dTTP (500 cpm/pmol) 0.025 mM. Cuando se añadieron antibióticos, la concentración final de éstos fue, normalmente, de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para Nov y Rif, y de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para Cm.

La mezcla se mantuvo 5 min a 0°C antes de que se iniciara la reacción por transferencia a la temperatura de ensayo (generalmente 30°C), a la que se incubó durante el tiempo deseado (120 min, a no ser que se diga otra cosa). La reacción se terminó mediante la adición de 200 μl de solución de parada, compuesta por NaOH 0.5 M, SDS 0.5%, pirofosfato sódico 15 mM y DNA de timo de ternera sonificado 0.5 mg/ml. La

mezcla se transfirió a 0°C y, tras añadir 500 μ l de TCA 2 M frío, se mantuvo durante 10 min a esta temperatura y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio tipo GF/A, de 2.5 cm de diámetro. Los filtros se lavaron 3 veces con 3 ml de TCA al 5%, una vez con 5 ml de etanol absoluto y una vez con 5 ml de éter etílico, todo ello a 0°C. Los filtros se secaron a 45°C durante 1 hora, se introdujeron en viales conteniendo 2.5 ml de un líquido de centelleo compuesto por tolueno, PPO 6.5 g/l y POPOP 0.065 g/l, y se contaron en un contador de centelleo. La replicación se midió como pmoles de dTMP incorporados al material precipitable por TCA. Teniendo en cuenta la actividad específica final de la [3 H]-dTTP y la eficiencia del contador utilizado, 1 pmol de dTMP corresponde, aproximadamente a 500 cpm. En los experimentos en los que se utilizaron extractos que no contenían plásmido endógeno, se incluyó una muestra a la que no se le añadió DNA plasmídico, y su valor en cpm fue considerado como fondo y descontado del valor del resto de las muestras en los ensayos de replicación. Cuando se utilizaron extractos preparados a partir de cultivos que contenían un plásmido de tipo pLS1, se tomó como fondo el valor obtenido para las muestras a las que se adicionó Nov, ya que este antibiótico bloqueaba totalmente la replicación de estos plásmidos.

Análisis de los productos de replicación.

Los productos de los ensayos de replicación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa y posterior fluorografía.

Se prepararon mezclas de reacción estándar, que se incubaron a 30°C durante 2 horas, y entonces las reacciones fueron detenidas mediante transferencia a 0°C y adición de EDTA a una concentración final de 50 mM. A continuación se añadieron 75 μ l de tampón TE(10:1) para llevar el volumen final a 100 μ l, y se procedió a fenolizar las muestras como se ha descrito en el apartado 8 de este capítulo. Una vez precipitado con etanol, el DNA fue recogido por centrifugación y disuelto en 20 μ l de tampón TE(10:1), siendo sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. El gel fue teñido, fotografiado y, después de señalar la posición de las distintas formas del DNA, tratado para fluorografía con el fin de visualizar los productos de nueva síntesis marcados radiactivamente.

Los productos de reacción de ensayos en los que se empleó como precursor marcado [35 S]-dATP (8 μ Ci/ μ l; 400 Ci/mmol) fueron también analizados. Para ello, se prepararon cócteles a los que se añadió este precursor en lugar de [3 H]-dTTP, de forma que la concentración final de [35 S]-dATP en el ensayo fuera de 0.4 μ M o 0.8 μ M. Las muestras fueron procesadas como se describe en el párrafo anterior, excepto que los geles, en lugar de ser tratados para fluorografía, fueron secados bajo vacío y autorradiografiados.

Para cuantificar la distribución de radiactividad en los geles, una vez realizada la

fluorografía o autorradiografía de los mismos, se cortaron los trozos de gel seco correspondientes a las diferentes formas de DNA marcado, y a cada uno se le añadió 1 ml de DMSO para disolver la agarosa y 15 ml de líquido de centelleo Ready-solv HP/b. La radiactividad de las distintas muestras se determinó en un contador de centelleo.

17. FLUOROGRAFIA.

17.1. Fluorografía de geles de agarosa.

Se siguió el método descrito por Ludlow y cols (1985). Los geles pueden someterse a este tratamiento una vez teñidos con EtBr, ya que éste se elimina completamente durante las etapas de inmersión del gel en etanol. De no ser eliminado, el EtBr apantalla fuertemente la luz ultravioleta emitida por los agentes de centelleo, disminuyendo así la eficiencia del método.

El gel se mantuvo sumergido en 4 volúmenes de etanol absoluto durante 30 minutos, a temperatura ambiente y agitando muy suavemente. Este proceso se repitió dos veces más. A continuación, el gel se empapó en 4 volúmenes de una solución de PPO al 3% (p/v) en etanol absoluto, y se mantuvo en ella durante 3 horas. En esta etapa y en las tres anteriores, es importante utilizar contenedores que cierren bien para evitar la absorción de agua. Por último, el gel se sumergió durante 30 min en agua destilada para precipitar el PPO. Para secar el gel, éste fue colocado sobre una pila de papeles de filtro, cubierto con una hoja de plástico y, cuando su espesor quedó reducido a 1 ó 2 mm, fue secado en un secador de geles bajo vacío, a 60°C, durante 90 min. La exposición de la película al gel seco se realizó a -70°C.

17.2. Fluorografía de geles de PAA.

Este método, basado en el descrito por Laskey y Mills (1975), se ha empleado con una variedad de geles de PAA/SDS para proteínas.

Una vez teñido, desteñido y fotografiado, el gel se sumergió directamente en 20 volúmenes de DMSO, y se mantuvo así durante 30 min. Después de renovar el DMSO, se prosiguió esta etapa durante 60 min más, con el fin de eliminar completamente el agua. El gel se sumergió, entonces, en 4 volúmenes de una solución de PPO al 22% en DMSO,

durante 3 horas. Estas etapas se realizaron en contenedores cerrados para evitar la absorción de agua. A continuación el gel se mantuvo en agua durante 1 hora para eliminar el DMSO y precipitar el PPO en el interior del gel. Esta etapa se repitió nuevamente. Todos estos procesos se realizaron a temperatura ambiente y con suave agitación. Después de secar el gel bajo vacío durante 2 ó 3 horas, se realizó la exposición de la película a -70°C .

18. DETERMINACION DE LOS PUNTOS DE INICIACION DE mRNAs MEDIANTE MAPEO CON NUCLEASA S1.

Preparación de RNA total bacteriano.

Para la obtención de RNA total de células de *S.pneumoniae* se siguió, básicamente, el método descrito por Aiba y cols (1981), con las modificaciones descritas por López y cols (1989).

Se recogieron por centrifugación las células de 50 ml de cultivo crecido hasta una DO de 0.4. El sedimento celular se resuspendió en 2.5 ml de solución de lisis (acetato sódico 20 mM pH 5.5, EDTA 1 mM, Na-DOC 0.1%) y se procedió a lisar las células mediante tres ciclos consecutivos de rápida congelación (-80°C)-descongelación (37°C). A continuación se añadió SDS a una concentración final de 0.5% y se mezcló brevemente a 37°C . Los lisados se trataron, a 70°C durante 5 min, con 2 volúmenes de fenol saturado con acetato sódico 20 mM pH 5.5. Las fases fenólica y acuosa se separaron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 5 min en el rotor JA-20. Este proceso de fenolización se repitió dos veces más antes de que el RNA presente en la última fase acuosa fuera precipitado por adición de 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 7 y 3 volúmenes de etanol absoluto. El RNA fue nuevamente precipitado con 0.07 volúmenes de acetato sódico 3 M y 3 volúmenes de etanol. El sedimento resultante de la centrifugación se lavó dos veces con etanol al 70% y, tras secarse brevemente bajo vacío, se disolvió en tampón TE(10:1). Las preparaciones de RNA se repartieron en alícuotas y se conservaron a -70°C . La concentración del RNA en las muestras se determinó a partir del valor de absorción a 258 nm, teniendo en cuenta que un valor de 1 equivale aproximadamente a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNA. Las preparaciones se consideraron suficientemente puras cuando la relación entre los valores de la absorción a 258 y 280 nm fue, al menos, 2. La integridad de los mRNAs se asumió comprobando la de los RNAs ribosomales (23, 16 y 5 S), mediante electroforesis en gel de agarosa.

Mapeo con S1.

El procedimiento utilizado para determinar los puntos de iniciación de mRNAs fue el descrito por López y cols (1989).

Para preparar la sonda, un fragmento de DNA que contenía el putativo sitio de iniciación de la transcripción (nucleótido +1) se marcó en sus extremos 5'. La marca de la cadena codificante se eliminó mediante digestión con un segundo enzima de restricción, y el fragmento que se iba a utilizar como sonda se purificó como se describe en el apartado 11.

Las condiciones de ensayo en lo que respecta a cantidad de RNA, temperatura de hibridación, unidades de nucleasa S1 y temperatura de incubación con la misma, fueron puestas a punto para cada experimento.

Los ácidos nucleicos de mezclas que contenían:

- 30000 cpm Cerenkov del DNA prueba (aprox. 0.1 μ g)
- 100-200 μ g de RNA total.
- tRNA (para llevar la cantidad total de RNA a 200 μ g).
- Tampón TE(10:1) (para llevar el volumen total de la mezcla a 200 μ l).

fueron precipitados mediante la adición de acetato sódico y etanol absoluto. El sedimento obtenido por centrifugación fue lavado con etanol al 70%, secado brevemente bajo vacío y disuelto en 10 μ l de tampón de hibridación 5x (PIPES 200 mM pH 6.3, NaCl 2 M, EDTA 5 mM). A continuación se añadió formamida para dar una concentración final del 70%, y se completó el volumen a 50 μ l con agua. Las muestras se incubaron a 85°C durante 10 min y se transfirieron rápidamente a baños de agua a la temperatura de hibridación, donde se mantuvieron sumergidas durante 3 h. Al cabo de este tiempo, se añadieron 450 μ l del tampón de S1 (acetato sódico 30 mM pH 4.6, NaCl 280 mM, ZnSO₄ 4.5 mM, DNA de tимо sonificado 20 μ g/ml) conteniendo 50 u de nucleasa S1. Después de permitir la actuación del enzima a 30°C durante 20 min, la reacción fue parada por transferencia de las muestras a 0°C y adición de 115 μ l de tampón de parada (acetato amónico 2.5 mM, EDTA 50 mM pH 8). Las muestras fueron fenolizadas y los ácidos nucleicos precipitados con isopropanol como se describe en el apartado 8. El exceso de sales se eliminó mediante dos lavados con etanol al 70% y el precipitado se disolvió en 5 μ l del tampón de carga BXF. Previamente a la electroforesis, las muestras fueron calentadas a 95°C durante 5 min y enfriadas a 0°C. La electroforesis y la autorradiografía se efectuaron como en el caso de las reacciones de secuenciación (apartado 14). Hay que tener en cuenta que, debido a las diferentes características de los productos de digestión química y enzimática del DNA, los fragmentos marcados producidos en las reacciones

de secuenciación mediante el método de Maxam y Gilbert migran 1.5 nts más rápido que los fragmentos correspondientes generados por digestión con S1 de los híbridos RNA-DNA (Sollner-Webb y Reeder, 1979).

19. SINTESIS DE PROTEINAS PLASMIDICAS EN MINICELULAS DE *B.SUBTILIS*.

Purificación de minicélulas.

Se siguió el método descrito por Reeve y cols (1973), utilizándose la estirpe CU403 de *B.subtilis* conteniendo los plásmidos de interés.

Se aislaron colonias de la estirpe elegida sobre medio sólido TY suplementado con el antibiótico correspondiente. Varias colonias de aspecto translúcido fueron empleadas para inocular 100 ml de medio completo para minicélulas que contenía la concentración adecuada del antibiótico. Una vez crecido, el cultivo sirvió a su vez de inóculo para 900 ml del mismo medio. El cultivo fue crecido a 37°C con agitación hasta que abandonó la fase exponencial. Después de comprobar la existencia de minicélulas mediante microscopía de contraste de fase, el cultivo fue centrifugado a 8500 rpm durante 1 h, a 4°C, en el rotor JA10. El sedimento celular se lavó con 10 ml de sales para minicélulas y la suspensión se centrifugó a 12000 rpm, durante 30 min, a 4°C. Las células fueron resuspendidas en 4 ml de las sales, y 2 ml de esta suspensión fueron aplicados sobre 30 ml de un gradiente continuo de sacarosa del 5% al 30%, preparado en las sales para minicélulas. Los gradientes fueron centrifugados a 4500 rpm, durante 15 min, a 4°C, en el rotor SW27 (Beckman). Tras la centrifugación, las minicélulas se encontraban en una banda muy dispersa, que fue recogida y transferida a tubos Corex de 15 ml. Las células fueron recogidas por centrifugación a 12000 rpm, durante 20 min, a 4°C, y resuspendidas en 2 ml de las sales. La muestra fue nuevamente aplicada a gradientes de sacarosa. Tras centrifugar a 4000 rpm, 15 min, a 4°C, se recogió la banda de minicélulas, que esta vez presentaba un aspecto más nítido. Las células se recogieron nuevamente por centrifugación a 12000 rpm durante 30 min, se lavaron con 4 ml de las sales y, tras una centrifugación de 10 min a la misma velocidad, se resuspendieron en 6 ml de sales. El número de minicélulas presentes en la preparación se determinó a partir del valor de la absorción a 600 nm, teniendo en cuenta que una $DO_{600} = 0.5$ equivale a unas 4×10^9 minicélulas/ml. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en el volumen apropiado de sales para conseguir una concentración de 10^{10} minicélulas/ml. También se determinó el número de células viables contaminantes de la suspensión. Este

número debía ser inferior a 5×10^5 u.f.c./ml. Después de añadir glicerol al 10% e incubar a 37°C durante 10 min, las preparaciones de minicélulas se repartieron en alícuotas de 200 μ l, que se congelaron y conservaron a -70°C.

Marcaje de proteínas en minicélulas.

Para el marcaje de proteínas plasmídicas en minicélulas se siguió el método descrito por Espinosa y cols (1984).

Una alícuota (200 μ l) de la preparación de minicélulas se incubó durante 5 min a 32°C en presencia de glucosa y timina a unas concentraciones finales del 1% y de 40 μ g/ml, respectivamente. A continuación se añadieron 8 μ Ci de un aminoácido marcado radiactivamente, prosiguiéndose la incubación durante 30 min más. La incorporación de radiactividad se detuvo por adición de 1 ml de tampón de parada (EDTA 0.1 M, NaCl 0.05 M, PMSF 25 μ g/ml) que contenía 0.1 mg del aminoácido frío correspondiente. Las minicélulas se sedimentaron por centrifugación durante 15 min, a 4°C, en microcentrífuga. El sedimento se lavó dos veces con 1 ml del tampón de parada y finalmente se resuspendió en 37.5 μ l del mismo tampón conteniendo 1 mg/ml de lisozima. Tras 15 min de incubación a 37°C, se añadieron 5 μ l de SDS al 10% para completar la lisis celular, y 10.5 μ l del tampón de carga SLB(5x). La mitad de la muestra se sometió a SDS-PAGE en gradiente continuo del 5% al 25% de PAA. Las proteínas codificadas por el plásmido en estudio se visualizaron mediante fluorografía de los geles.

20. HIPEREXPRESION DE GENES BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR ϕ 10 DEL FAGO T7.

El sistema de clonaje vector pET5/huésped BL21(DE3), descrito por Studier y Moffatt (1986), permite la hiperexpresión específica de genes clonados bajo el control del promotor ϕ 10 del fago T7.

Descripción del sistema.

La estirpe BL21(DE3) de *E.coli* contiene un profago defectivo derivado de lambda (lisógeno DE3) que lleva el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor inducible *lacUV5*. La RNA polimerasa de T7 tiene una gran especificidad

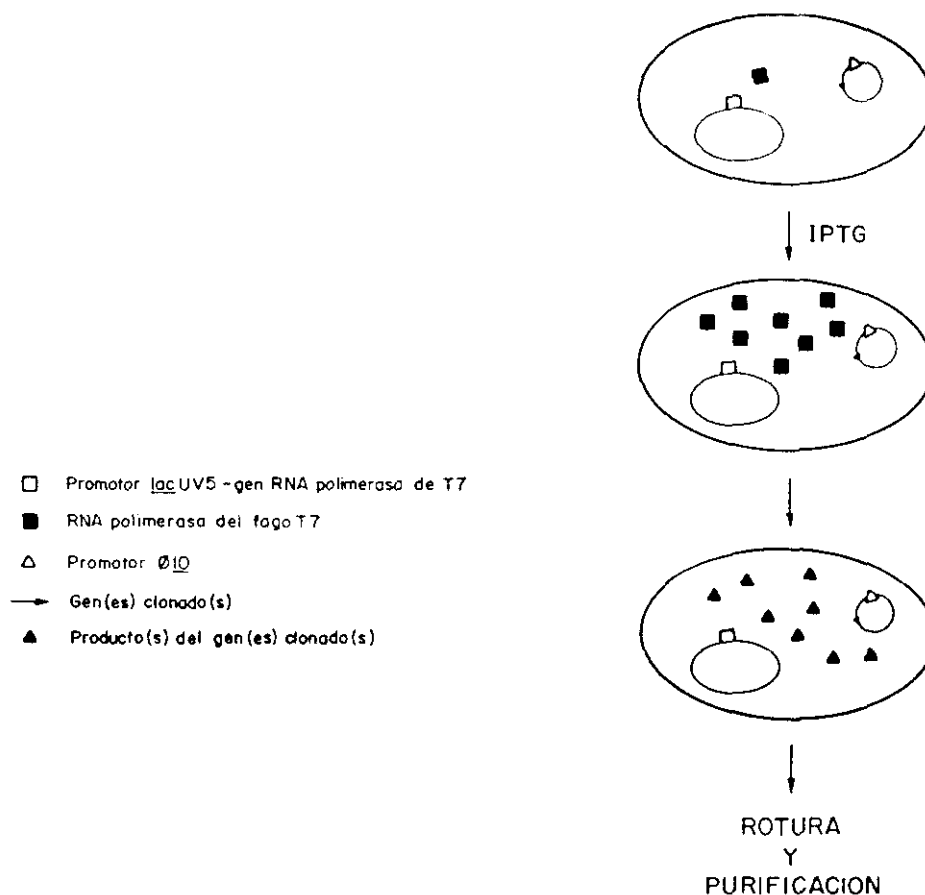


Figura 7. Esquema del sistema de hiperexpresión génica basado en la especificidad de transcripción por la RNA polimerasa de T7. La estirpe de *E. coli* utilizada, BL21(DE3), lleva en el cromosoma el gen que codifica la RNA polimerasa de T7, bajo el control del promotor inducible *lacUV5* (□). El plásmido vector pET5 contiene el promotor $\phi 10$ (Δ) reconocido por la RNA polimerasa de T7. Los genes cuya hiperexpresión se pretende, se clonan en pET5 bajo el control de $\phi 10$ (→). La adición de IPTG induce la actividad del promotor *lacUV5*, sintetizándose gran cantidad de RNA polimerasa de T7 (■). Esto conduce a la hiperexpresión específica de los genes clonados bajo el control de $\phi 10$. Los productos de dichos genes (▲) pueden ser purificados previa lisis celular.

por sus propios promotores y una gran eficiencia de iniciación y elongación de las cadenas de RNA. Además, terminadores de la transcripción para otras RNA polimerasas son muy poco eficientes para este enzima. Como estirpe para la expresión génica, BL21(DE3) tiene la ventaja de carecer de las proteasas codificadas por los genes *lon* y *ompT*, que podrían degradar las proteínas durante su purificación.

El plásmido pET5 deriva de pBR322 y se ha utilizado en este sistema como vector de transcripción para el clonaje y expresión de genes. Este plásmido contiene un promotor ($\phi 10$) reconocido por la RNA polimerasa de T7, seguido por un sitio único para cada uno de los enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. El plásmido pET5 no contiene, sin embargo, señal para la iniciación de la traducción, por lo que el gen en cuestión debe ser clonado con su propia señal. Este vector confiere únicamente resistencia a Ap, ya que el DNA entre los sitios únicos *Bam*HI y *Eco*RI de pBR322 (incluyendo el promotor *tet*) ha sido deletado.

La adición de IPTG al sistema induce el promotor *lacUV5*, de forma que se activa

la síntesis de la RNA polimerasa de T7. Esta, a su vez, promoverá la transcripción a partir del promotor $\phi 10$, produciendo transcritos de varias veces la longitud del plásmido. En muchos casos la transcripción por la RNA polimerasa de T7 es tan activa que la síntesis de RNA debida a la polimerasa del huésped no puede competir y cesa casi por completo. La adición de Rif (inhibidor de la RNA polimerasa del huésped pero no de la del fago) resultará en la expresión específica de los genes plasmídicos correctamente orientados respecto al promotor del fago. Un esquema de las características y funcionamiento del sistema de expresión BL21(DE3)/pET5 se muestra en la Figura 7.

Condiciones de crecimiento e inducción.

Antes de proceder a la purificación de un determinado producto génico, se pusieron a punto, utilizando cultivos a pequeña escala, las condiciones de crecimiento, inducción y tratamiento con antibióticos, que dieran un mayor rendimiento de la proteína deseada. Asimismo, observamos que diversos plásmidos diseñados para la expresión de un mismo gen, requerían distintas condiciones para una expresión óptima.

Se preparó un preinóculo de la estirpe deseada [BL21(DE3) conteniendo el plásmido de interés] en 5 ml de medio M9 suplementado con el antibiótico correspondiente (Ap a 200 $\mu\text{g/ml}$, Tc a 10 $\mu\text{g/ml}$, o Ap 200 $\mu\text{g/ml}$ + Tc 10 $\mu\text{g/ml}$). Cuando el cultivo alcanzó una DO de 0.5, se diluyó 25 veces en 5 ml del mismo medio y se incubó a 37°C con agitación (250 rpm), siguiendo la DO hasta que ésta llegó a 0.4-0.45. Según hemos observado experimentalmente (capítulo de Resultados), éste es el momento óptimo para proceder a la inducción de los cultivos, ya que se evita la acumulación de células sin plásmido o con un sistema no funcional. Para ensayar las condiciones de inducción, se tomaron muestras de 1 ml del cultivo anterior y se les añadió el inductor, IPTG, a una concentración final de 0.5 mM o 1 mM. La incubación a 37°C se prosiguió durante distintos tiempos (30 min a 3 h). En las muestras tratadas con Rif, ésta se añadió entre 0 min y 30 min después de la adición del IPTG. Las muestras tratadas con el antibiótico fueron incubadas a 37°C un tiempo variable (30 min a 3 h) en presencia de 0.2 mg/ml de Rif.

Marcaje de proteínas de nueva síntesis.

A muestras de 1 ml tratadas como se describe en el párrafo anterior, se les añadieron 50 μl de [^{35}S]-metionina (a 1 mCi/ml). Después de incubar durante 10 min a

37°C, se paró la incorporación de marca por transferencia de las muestras a 0°C y adición de 0.1 mg de metionina fría. Las células fueron recogidas por centrifugación en microcentrífuga, durante 5 min, a 4°C, y lavadas con 1 ml de medio M9 suplementado con 1 mg/ml de metionina fría. Tras centrifugar nuevamente, el sedimento celular fue resuspendido en 1 ml de tampón de rotura (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, SDS 2%, EDTA 2 mM, β ME 1%, glicerol 10%). Las muestras fueron incubadas a 95°C durante 3 min para producir la lisis celular. Tras la adición de 250 μ l de SLB(5x), las muestras quedaron listas para ser sometidas a SDS-PAGE. La tinción de las proteínas de estos geles da una idea de la concentración y proporción relativa de la proteína de interés en las diversas condiciones ensayadas. La autorradiografía o fluorografía de los geles permitió analizar cuantitativa y cualitativamente las proteínas que se sintetizan tras el período de inducción y expresión.

Cuando el marcaje se empleó para seguir la proteína de interés durante las etapas de purificación, se evitó el empleo de SDS para lisar las células. En este caso, el sedimento celular, una vez lavado con M9, se resuspendió en 1 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 7.6 que contenía 250 μ g de lisozima. La muestra se mantuvo en hielo durante 30 min, añadiéndose a continuación 45 μ l de Tritón X-100 al 5%, y se agitó la mezcla hasta conseguir la lisis. El extracto obtenido se mezcló con el que contenía la proteína a purificar.

Test de funcionalidad del sistema.

Algunos de los genes clonados en el vector pueden dar lugar a productos tóxicos para la bacteria. Si esto ocurre, pequeños escapes del promotor *lacUV5* en ausencia del inductor pueden conducir a la muerte de las células bacterianas durante el crecimiento del cultivo. Por otra parte, la β -Lactamasa especificada por el vector es secretada al medio y, en cultivos suficientemente crecidos, puede degradar grandes cantidades de Ap, permitiendo el crecimiento de células sin plásmido. La combinación de estos dos factores podría determinar que, en el momento de la inducción, muy pocas células tuvieran el sistema funcional. Antes de que los cultivos fueran inducidos, se determinaron los porcentajes de células con plásmido y de células en las que el sistema era funcional. Para ello, se realizaron diluciones adecuadas del cultivo, y el porcentaje de células con plásmido se determinó como:

$$\frac{\text{u.f.c. en medio TY con Ap } 200 \mu\text{g/ml}}{\text{u.f.c. en medio TY}} \times 100$$

Por otra parte, las células de la estirpe BL21(DE3) no pueden crecer en presencia de IPTG si llevan el promotor $\phi 10$ asociado a un gen. Por el contrario, células que no contienen un sistema funcional son capaces de formar colonias en presencia del inductor. Entre estas células capaces de crecer en IPTG se incluyen las que han perdido el plásmido, así como mutantes que carecen de capacidad para expresar el DNA diana. El porcentaje de células que carecen de sistema funcional se determinó, por lo tanto, como:

$$\frac{\text{u.f.c. en TY con IPTG } 125 \mu\text{M}}{\text{u.f.c. en TY}} \times 100$$

Por su parte, sólo mutantes que conserven el plásmido pero sean incapaces de expresar el DNA diana crecerán tanto en presencia de Ap como de IPTG. El porcentaje de estos mutantes se calculó:

$$\frac{\text{u.f.c. en TY con Ap } 200 \mu\text{g/ml} + \text{IPTG } 125 \mu\text{M}}{\text{u.f.c. en TY}} \times 100$$

21. CROMATOGRAFIA DE PROTEINAS.

21.1. Filtración en gel.

El material empleado fue agarosa Bio-Rad A-0.5 m (200-400 mesh). El gel se empaquetó en una columna de Pharmacia K16, de forma que el lecho resultante tenía 1.6 cm de diámetro y 84 cm de altura (169 ml de volumen total). Para equilibrar la agarosa, así como para eluir las proteínas, se utilizó el tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, EG 5%, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). La velocidad del flujo fue de 18 ml/h. El volumen de muestra aplicado fue de 3 ml, que corresponde a un 1.8% del volumen total de la columna. La recogida de fracciones y la medida y registro de la absorción de las mismas a 280 nm se realizó con un equipo ISCO, colectándose fracciones de 2 ml.

21.2. Cromatografía de intercambio iónico.

Se utilizó DEAE-Sephacel de Pharmacia como intercambiador aniónico. El gel se empaquetó en una columna K9 de la misma casa. Las dimensiones del lecho fueron 0.9 cm de diámetro y 13 cm de altura (8.3 ml de volumen total). Se empleó el tampón B (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EG 5%, EDTA 1 mM, DTT 5 mM) suplementado con KCl 100 mM. El flujo fue ajustado a 14 ml/h, recogiendo fracciones de 4 ml.

21.3. Cromatografía de afinidad.

El adsorbente empleado para este tipo de cromatografía fue heparina-agarosa Affi-Gel (Bio-Rad). Se empleó una columna Bio-Rad con un lecho de 1.4 cm de diámetro y 4 cm de altura (6.2 ml de volumen total). El flujo se ajustó a 14 ml/h. La columna fue equilibrada con tampón B suplementado con KCl (a la concentración que se indica en el apartado de Resultados correspondiente). Después de la aplicación de la muestra, el gel se lavó con 75 ml (12 volúmenes de columna) del mismo tampón. Las proteínas adsorbidas al gel se eluyeron mediante la aplicación de un gradiente lineal de KCl, preparado en tampón B. Las proteínas que aún permanecieron unidas se eluyeron haciendo pasar a través de la columna una solución de KCl 2 M en tampón B.

La conductividad de las distintas fracciones se midió con el conductímetro Metrohm E382. Se construyó una recta patrón representando la conductividad de distintas soluciones de KCl en tampón B en función de la concentración de la sal. La molaridad del KCl en las fracciones se determinó por extrapolación a partir de esta recta patrón.

El gel de heparina-agarosa se regeneró para su reutilización mediante el lavado con 10 volúmenes de columna de tampón I (Tris-HCl 20 mM pH 8.5, NaCl 0.5 M), seguido por lavado con el mismo volumen de tampón II (Tris-HCl 20 mM pH 5.5, NaCl 0.5 M), tal como recomendó la casa proveedora.

Cuando no estaban siendo utilizadas, todas las columnas se mantuvieron en presencia de acido sódico al 0.02%.

22. DETERMINACION DE LA CONFIGURACION NATIVA DE PROTEINAS.

22.1. Centrifugación analítica en gradiente de glicerol.

Se prepararon gradientes lineales de glicerol del 15% al 35% en un tampón compuesto por Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM. Los gradientes (4 ml) fueron preformados en tubos para el rotor SW60 (Beckman). Aparte de la proteína cuya configuración se deseaba analizar, se prepararon soluciones de las proteínas usadas como marcadores de peso molecular, a una concentración de 2 mg/ml. Todas las proteínas se encontraban en el mismo tampón utilizado para los gradientes, conteniendo glicerol al 15%. Las muestras (150 μ l) se aplicaron sobre los gradientes antes de proceder a centrifugar a 59000 rpm durante 15 h en rotor SW60, a 4°C. Tras la centrifugación, se recogieron fracciones de 100 μ l por punción en la base de los tubos, y se determinó la absorción a 280 nm o la radiactividad (en su caso) de las distintas fracciones. Por representación del log de los pesos moleculares de las proteínas patrón frente a las distancias relativas recorridas, se determinó una recta que permitió deducir el peso molecular de la forma nativa de la proteína problema.

Las proteínas utilizadas como patrones fueron: albúmina de suero bovino (66 kDa), DNasa I (31 kDa), lisozima (14.4 kDa) y aprotinina (6.5 kDa).

22.2. Filtración en gel.

Se utilizó una columna de agarosa (Bio-Rad A-0.5 m, 200-400 mesh) montada en una pipeta de 25 ml. Las dimensiones del lecho fueron 1.14 cm de diámetro y 38.5 cm de altura (39 ml de volumen total). Se empleó tampón B suplementado con KCl 200 mM. La velocidad del flujo se ajustó a 6 ml/h. Todas las muestras que se iban a correr se encontraban en el tampón de columna, y el volumen aplicado fue de 300 μ l (0.77% del volumen del lecho). Las soluciones empleadas como patrones, y cargadas por separado (para evitar interferencias) fueron: azul de dextrano (2 mg/ml), mezcla de albúmina bovina (12 mg/ml) y citocromo C (6 mg/ml) y, por último, mezcla de anhidrasa carbónica (6 mg/ml) y aprotinina (9 mg/ml). Mediante el empleo de un equipo ISCO se recogieron fracciones de 0.5 ml y se determinó su absorción a 280 nm. La proteína problema fue detectada midiendo la radiactividad presente en las fracciones. El volumen de exclusión (V_o) de la columna se determinó como el volumen de elución del azul de dextrano (peso molecular aproximado: 2×10^6 Da). El volumen de elución (V_e) de los distintos patrones

fue también determinado, y se construyó una curva de calibrado representando el log de los pesos moleculares de estas proteínas frente a sus correspondientes valores V_e/V_o . A partir de esta curva se determinó el peso molecular de la proteína problema en su forma nativa.

Las proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular fueron: albúmina de suero bovino (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), citocromo C (12.4 kDa) y aprotinina (6.5 kDa).

23. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.

23.1. Preparación de las muestras para electroforesis.

Cuando las muestras no podían ser cargadas directamente en los geles debido a su baja concentración en proteínas, éstas fueron precipitadas a 0°C durante 30 min en presencia de TCA al 10%. El precipitado se recogió por centrifugación a 12000 rpm, durante 10 min, a 4°C, en microcentrífuga, y se lavó dos veces con etanol:éter (1:1) para eliminar los restos de TCA. Tras la última centrifugación, el sedimento se disolvió en el volumen apropiado de Tris-HCl 10 mM pH 8.8, siendo procesado como se describe a continuación.

En general, a la muestra que iba a ser sometida a electroforesis se le añadió 1/4 de volumen de SLB(5x). La muestra se incubó a 95°C durante 3 min, y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de ser cargada en el gel.

Cuando se iba a realizar la electroforesis en presencia de urea, las muestras se ajustaron a 7 mM de fosfato sódico (pH 7.2), 1% de SDS, 1% de β ME, 0.02% de azul de bromofenol y 6 M de urea, siendo a continuación procesadas como se describe en el párrafo anterior.

23.2. Geles de PAA/SDS.

Se utilizó una variedad de geles con diversos porcentajes de PAA (tanto lineales como en gradiente continuo de concentración). La proporción de acrilamida a bisacrilamida empleada fue 30:0.8. Los geles contenían, además, Tris-HCl 0.15 M pH 8.8, SDS 0.1%, EDTA 2 mM, TEMED 0.05% y PSA 0.08%. Las dimensiones de los geles fueron 14.5 cm de ancho, 14 cm de largo y 1.2 mm de espesor.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 150 V, durante el tiempo deseado, en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8.3, glicina 380 mM, SDS 0.1% y EDTA 2 mM.

Tras la electroforesis, las proteínas se visualizaron por tinción con una solución de CBB R-250 al 0.25% en agua:metanol:ácido acético glacial (4:5:1, en volúmenes), durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación suave. El colorante no unido a las bandas de proteínas se eliminó sumergiendo los geles en un destañador compuesto de ácido acético glacial al 7.5% y metanol al 5%, durante 12-16 h.

Cuando se deseó visualizar proteínas marcadas radiactivamente (con ^{35}S o ^3H), los geles fueron preparados para fluorografía.

23.3. Geles de PAA/SDS/urea.

Para la resolución de polipéptidos de peso molecular menor de 14 kDa, se utilizó el sistema de gel de concentración-gel de resolución conteniendo urea, recomendado por BRL (FOCUS 6:3).

El gel de resolución contenía PAA al 15% (acrilamida:bisacrilamida, 30:0.8), fosfato sódico 0.1 M pH 7.2, SDS 0.1%, urea 6M, TEMED 0.05% y PSA 0.02%. El gel de concentración contenía PAA al 7.5% (30:0.8), fosfato sódico 0.1 M pH 7.2, SDS 0.1%, urea 6M, TEMED 0.05% y PSA 0.2%. Las dimensiones totales del gel fueron las mismas que en el apartado anterior.

La electroforesis se llevó a cabo a 80 V, hasta que el azul de bromofenol quedó a 1 cm del borde inferior del gel. El tampón de electroforesis contenía fosfato sódico 0.1 M pH 7.2 y SDS 0.1%.

Para aumentar la tinción de los polipéptidos pequeños, los geles se tiñeron con una solución compuesta de CBB 0.1%, acetato cúprico 0.1%, isopropanol 25% y ácido acético 10%. La destinción de los geles se efectuó como en el apartado anterior.

Si estos geles se iban a tratar para fluorografía, la urea debía ser eliminada antes de proceder a la impregnación. Por ello, si los geles no habían sido teñidos-destañados previamente, se sumergieron durante 30 min en el destañador definido en el apartado anterior.

23.4. Geles de PAA/SDS con DNA en la matriz.

Se prepararon geles en gradiente continuo del 10% al 20% de PAA

(acrilamida:bisacrilamida, 30:0.8). Los geles contenían, además, Tris-HCl 0.15 M pH 8.8, SDS 0.1%, EDTA 2 mM, DNA de timo de ternera 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, albúmina de suero bovino 13.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, TEMED 0.05% y PSA 0.08%. Las dimensiones de los geles, así como las condiciones de electroforesis fueron las descritas en el apartado 23.2.

Tras la electroforesis, los geles se lavaron tres veces con 500 ml de una solución compuesta por Tris-HCl 40 mM pH 7.6 y MgCl_2 2 mM, incubándose a continuación en el mismo tampón, durante 16 h a 37°C, con suave agitación. El DNA de los geles se tiñó añadiendo EtBr al tampón, a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cuando se deseó, las proteínas de estos geles se visualizaron por tinción con CBB.

24. VALORACION DE PROTEINAS.

24.1. Utilización del reactivo BCA.

La concentración de proteínas de una muestra se determinó mediante la utilización del reactivo BCA (Pierce). Los ensayos fueron realizados como se recomienda en el protocolo de la casa suministradora.

24.2. Densitometría de geles teñidos con CBB.

Este método, descrito por Bennett y Scott (1971), se utilizó para estimar la concentración relativa de una proteína en una mezcla. También se empleó para determinar la concentración de una proteína en una muestra por comparación con una solución estándar de la misma proteína. Se realizó la densitometría directa de geles secados bajo vacío.

24.3. Determinación de la concentración molar.

La concentración proteica en la preparación de RepA pura se determinó mediante el análisis de la composición molar de aminoácidos. Este análisis se realizó por los servicios de Química de Proteínas del CIB. La muestra fue hidrolizada en fase gaseosa, durante 20 h a 110°C, en presencia de HCl 6 N y ácido tioglicólico 5%. Los aminoácidos se analizaron mediante un equipo Biotronik LC-7000.

25. DETERMINACION DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE RepA.

La secuenciación automática de la proteína intacta se realizó en el Max-Planck Institut für Molekulare Genetik (Berlín) por la Dra. T. Choli. Se empleó un secuenciador Applied Biosystems, mod. 477A con detección en línea de los aminoácidos liberados. La proteína se disolvió en 20 μ l de ácido trifluoroacético al 100% y se dispersó en un filtro de fibra de vidrio que se había pretratado con 2 mg de Polybrene.

26. DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL DE RepB.

Una muestra (10 ml) de la proteína pura procedente de la segunda columna de heparina-agarosa se dializó frente a NH_4HCO_3 0.1 M. Tras la adición de 0.5 mg de SDS, la muestra fue liofilizada y redisolta cuatro veces en 0.5 ml de agua bidestilada, con el fin de eliminar el NH_4HCO_3 . Unos 5 nmoles del polipéptido se procesaron en un secuenciador de fase gaseosa (Applied Biosystems) para determinar la secuencia N-terminal. Este análisis fue realizado por el Dr. M. Kimura en el Max-Planck Institut für Molekulare Genetik (Berlín).

27. ANALISIS DE CONTACTOS DNA-PROTEINA.

27.1. Protección frente a la digestión con DNasa I.

Se utilizó como sustrato un fragmento de DNA marcado en uno de sus extremos 5' o 3', con una actividad específica de $1\text{-}2 \times 10^7$ cpm/ μ g.

Cada ensayo contenía, en un volumen final de 50 μ l, entre 5 y 9 ng del fragmento marcado (de 25×10^{-3} a 76×10^{-3} pmoles, dependiendo del tamaño del fragmento y de la cantidad de DNA), MnCl_2 2 mM, KCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, EG 5%, y de 0 a 80 ng (0 a 16 pmoles) de proteína RepA pura. Las mezclas se incubaron 15 min a 20°C para permitir la unión de la proteína al DNA, antes de añadir entre 0.007 y 0.028 u de DNasa I (2.7 u/ μ g; libre de RNasas y proteasas). Tras permitir la digestión del DNA durante 5 min a 20°C, las reacciones fueron paradas por adición de 25 μ l de una solución compuesta por acetato amónico 2 M, EDTA 0.15 M, acetato sódico 0.8 M, DNA de timo de ternera sonificado 100 μ g/ml y tRNA 400 μ g/ml. El DNA

fue precipitado con etanol, lavado con etanol al 70% y disuelto en 18 μ l del colorante de carga BXF(1x). Las muestras (3 o 6 μ l, dependiendo de la anchura del pocillo) fueron procesadas como se describe en el apartado 10.3. La exposición autorradiográfica se llevó a cabo a -70°C , empleándose pantallas amplificadoras. En ocasiones, estos ensayos de protección por RepA frente a la digestión con DNasa I se realizaron en presencia de DNA inespecífico (0.5 μ g de DNA de timo de ternera sonificado).

27.2. Protección frente a la rotura por radical hidroxilo.

Este método, desarrollado por Tullius y Dombroski (1986), presenta dos importantes ventajas frente a los que utilizan una actividad enzimática. Por una parte, la acción del radical hidroxilo no depende, apenas, de la secuencia del DNA, por lo que todas las posiciones de éste pueden ser analizadas en cuanto a la existencia de contactos con proteínas. Además, debido a su pequeño tamaño, este reactivo permite una gran definición de los contactos proteína-DNA a lo largo del esqueleto del DNA.

La base química de este método es la siguiente: el complejo $[\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-}]$ produce radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno y, a su vez, el producto $[\text{Fe}(\text{EDTA})]$ de la reacción es reducido por ión ascorbato para formar de nuevo el complejo de Fe(II) que continuaría el proceso. Además, un complejo de Fe(II) negativamente cargado es una ventaja, ya que el reactivo no se asocia electrostáticamente con el DNA.

Justo antes de comenzar las reacciones, se prepararon las siguientes soluciones:

Fe(II). Solución 4 mM de sulfato amónico ferroso.

EDTA. Solución 8 mM de EDTA de más de un 99% de pureza.

Fe(II)-EDTA. Se preparó mezclando volúmenes iguales de las soluciones de Fe(II) y EDTA.

H₂O₂. Peróxido de hidrógeno al 6%.

Ascorbato sódico. Solución 20 mM de ascorbato sódico.

Mezcla de reactivos. Se preparó mezclando volúmenes iguales de las soluciones de Fe(II)-EDTA, H_2O_2 y ascorbato sódico.

Hay que tener en cuenta que el glicerol, así como otros alcoholes y azúcares, inhiben fuertemente la reacción del radical hidroxilo. Por ello, la proteína conservada a $-70^\circ C$ en presencia de glicerol al 50% fue, o bien dializada (frente a Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, DTT 5 mM y KCl 50 mM), o bien diluida de forma que la concentración final de glicerol en el ensayo fue menor que 0.1%.

La unión de la proteína RepA al DNA se llevó a cabo en un volumen de 50 μl , en presencia de Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 100 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, 6 a 15 ng (30×10^{-3} a 127×10^{-3} pmoles) de fragmento de DNA marcado en uno de sus extremos 5' o 3', y 0.8 a 80 ng de proteína RepA pura (entre 0.16 y 16 pmoles). Asimismo, se realizaron ensayos controles a los que no se añadió la proteína. En algunos casos, las mezclas de reacción incluían, además, 0.5 μg de DNA competidor de timo de ternera. Todas las muestras fueron incubadas a $20^\circ C$ durante 15 min. La rotura del DNA por radical hidroxilo se inició por adición de 9 μl de la mezcla de reactivos, y se permitió proceder a $20^\circ C$ durante 7 min. Las concentraciones finales de los reactivos Fe(II), EDTA, H_2O_2 y ascorbato en los ensayos fueron 100 μM , 200 μM , 0.3% y 1 mM, respectivamente. Las reacciones fueron paradas por adición de 15 μl de una solución compuesta de acetato sódico 1.5 M pH 6.0, tiourea 40 mM y tRNA 0.7 $\mu g/\mu l$. El DNA de las mezclas se precipitó con etanol, se lavó con etanol del 70%, y finalmente se disolvió en 18 μl del colorante de carga BXF(1x). Las muestras fueron procesadas como se indica en el apartado anterior.

28. ENSAYOS DE TRANSCRIPCION *IN VITRO*.

Los fragmentos de DNA que iban a ser utilizados como molde para estos ensayos se prepararon por digestión de DNA plasmídico puro con uno o varios enzimas de restricción. Cuando los fragmentos presentaban extremos 5' protuberantes, éstos se convirtieron en extremos romos mediante el uso de Pol IK. Los fragmentos deseados se purificaron por electroforesis en geles de agarosa y extracción con "GeneClean".

Los ensayos de transcripción *in vitro* se llevaron a cabo en un volumen de 50 μl . Las mezclas de reacción contenían Tris-HCl 40 mM pH 8.0, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol 5%, GTP 200 μM , ATP 200 μM , UTP 50 μM , CTP 50 μM ,

α -[^{32}P]-UTP (400 Ci/mmol) 0.5 μM , y fragmento de DNA molde 10 nM. Las reacciones se iniciaron por adición de 0.15 u de la RNA polimerasa de *E.coli*, que se dejó actuar durante 10 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, las reacciones fueron paradas por transferencia de las muestras a 0°C y adición de 50 μl de una solución conteniendo acetato sódico 600 mM pH 6.0, EDTA 30 mM y tRNA 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Después de su precipitación y posterior lavado con etanol, los ácidos nucleicos fueron disueltos en el colorante de carga (formamida 98%, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%) y, tras su desnaturalización, fueron sometidos a electroforesis en geles de secuenciación (apartado 10.3). La muestra aplicada a cada pocillo (3 μl) contenía entre 5000 y 10000 cpm Cerenkov. La exposición autorradiográfica (2 a 5 días por lo general) se realizó a -70°C, utilizándose pantallas amplificadoras.

Para probar el efecto de la proteína RepA sobre la transcripción *in vitro* de un determinado gen, las mezclas de reacción se incubaron con distintas concentraciones (20 nM a 400 nM) de la proteína pura durante 10 min a 20°C, antes de la adición de la RNA polimerasa. En algunos ensayos, se permitió la unión del enzima antes de la adición de RepA. En estos casos, la RNA polimerasa fue añadida a mezclas que no contenían ninguno de los NTPs, y se incubó 10 min a 20°C. Tras la adición de RepA, la incubación se prosiguió durante otros 10 min, y la síntesis de RNAs se inició, entonces, por la adición de una mezcla de NTPs que contenía también el α -[^{32}P]-UTP.

29. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.

La actividad β -galactosidasa se ensayó en cultivos en fase exponencial de células de *E.coli* XL1-Blue (Tabla 1) conteniendo los plásmidos de interés. El método utilizado se basó en el descrito por Miller (1972).

Un preinóculo de la bacteria en cuestión se diluyó en medio TY hasta una DO de 0.05. Este cultivo se dividió en dos partes iguales, una de las cuales se puso en presencia de IPTG 2 mM. Ambos lotes del cultivo fueron crecidos hasta una DO = 0.6, momento en que fueron enfriados en hielo durante 20 min. Tras determinar nuevamente la DO de los cultivos a 600 nm, se tomaron 0.5 ml de cada uno de ellos y se mezclaron con 0.5 ml de tampón Z (Na_2HPO_4 0.06 M, NaH_2PO_4 0.04 M, KCl 0.01 M, MgSO_4 0.001 M, y βME 0.05 M). La lisis celular de estas muestras se consiguió por adición de 70 μl de cloroformo y 50 μl de SDS al 0.1%, seguida de agitación vigorosa durante 30 s. Tras incubar los extractos a 28°C durante 10 min, las reacciones se iniciaron por adición de 0.2 ml de una solución conteniendo 4 mg/ml de ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactósido) en

tampón fosfato 0.1 M, pH 7.0. Las mezclas se agitaron unos pocos segundos, y se continuó la incubación a 28°C hasta el desarrollo de coloración amarilla. Las reacciones se pararon añadiendo 0.5 ml de una solución 1 M de Na_2CO_3 , y se registró el tiempo total durante el que se permitió el desarrollo del color. Para cada muestra se determinó la DO tanto a 420 nm (suma de las absorciones debidas al color y a los restos celulares) como a 550 nm (en que sólo hay contribución de la absorción debida a los restos celulares). Para determinar las unidades de actividad β -galactosidasa se empleó la siguiente fórmula:

$$u = 1000 \times \frac{DO_{420} - 1.75 \times DO_{550}}{t \times v \times DO_{600}}$$

donde:

DO_{420} y DO_{550} son las lecturas de las mezclas de reacción,

DO_{600} refleja la densidad celular justo antes del ensayo,

t es el tiempo de reacción en minutos,

v es el volumen de cultivo usado en el ensayo (0.5 ml).

30. ANALISIS ASISTIDO CON ORDENADOR.

Se han utilizado los programas de computador DNASTAR (Inc., UK). La predicción de la estructura secundaria de RepA se realizó con la ayuda del programa PEPLOT (Gribskov y cols, 1986), incluido en los programas de computador UWGCG. Para la representación gráfica en la predicción de la estructura secundaria de RepA se empleó el programa PLOTCHOUFASMAN (desarrollado por B. Jameson, S. Modrow, M. Moth y H. Wolf del Instituto Max von Pettenkofer de la Universidad de Munich). Las predicciones de plegamiento del DNA se realizaron con la ayuda de los programas PCFOLD y MOLECULE, desarrollados por M. Zucker y por J.R. Thompson, respectivamente.

RESULTADOS

1. ESPECTRO DE HUESPED Y ESTABILIDAD DEL PLÁSMIDO pMV158 Y SUS DERIVADOS.

El plásmido natural pMV158 fue aislado de *S.agalactiae* (Burdett, 1980) y transferido a *S.pneumoniae* (Smith y cols, 1980; Saunders y Guild, 1980) y a *B.subtilis* (Espinosa y cols, 1982). Este plásmido confiere resistencia constitutiva a Tc mediada por un determinante de tipo *tetL*. Como se ha dicho en la Introducción, el mecanismo de resistencia asociado a *tetL* parece consistir en un sistema de bombeo de la Tc dependiente de energía (Burdett, 1986). En el caso de pMV158, el producto del gen *tet* es una proteína de membrana de 458 aminoácidos (50 kDa). El plásmido pLS1 se construyó por delección del fragmento EcoRI B de pMV158 (Fig. 8), y sus características y funciones han sido el objeto principal de este trabajo. La secuencia de pLS1 se numeró a partir de uno de los sitios PstI (Fig. 6), y dicha numeración es la utilizada en esta Tesis. Por lo tanto, las coordenadas de pLS1 que se mencionarán a lo largo de este trabajo pueden ser localizadas en la Figura 6. A partir de un plásmido recombinante basado en pLS1, y que contenía el gen *suld* del cromosoma de pneumococos, se obtuvieron varios derivados delecionados en *B.subtilis*. Todas estas delecciones, obtenidas *in vivo*, mapeaban en el

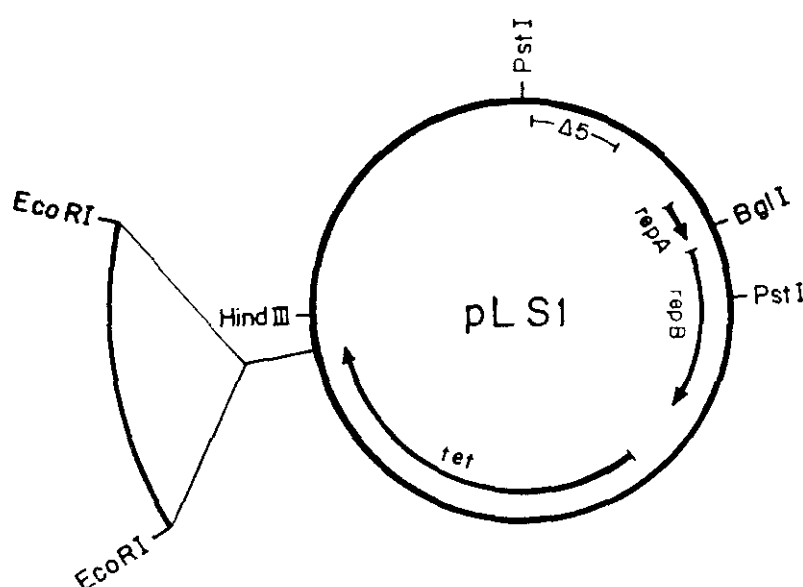


Figura 8. Mapa introductorio de pLS1. La línea exterior indica el fragmento EcoRI de 1.1 kb eliminado del plásmido natural pMV158 para la construcción de pLS1. Se muestra también la localización de una delección espontánea ($\Delta 5$) que afecta al plásmido pLS5. El mapa incluye algunos de los sitios de restricción más relevantes, así como los genes (con la dirección de transcripción indicada por una flecha) que dan lugar a las tres proteínas especificadas por pLS1.

fragmento PstI B de pLS1 y se seleccionaron por conferir mayor resistencia a sulfamida (determinada por el gen *sul*d), debido quizás al mayor número de copias de estos plásmidos respecto al parental. Por eliminación del inserto cromosómico del derivado delecionado más pequeño se construyó el plásmido pLS5, que carece de la región comprendida entre las coordenadas 34 y 365 (ambas incluidas) de pLS1 (Fig. 8). Tanto pLS1 como pLS5 fueron contruidos en *S.pneumoniae* y se transfirieron por transformación a *B.subtilis* y *E.coli*. Las eficiencias de transferencia de estos plásmidos a las tres especies, el número de copias en las mismas, así como la concentración de Tc a la cual se seleccionaron y crecieron las células con plásmido, quedan recogidas en la Tabla 3. El DNA transformante fue purificado a partir de pneumococos y utilizado a dos concentraciones distintas (0.1 y 1 µg por ml de transformación). Se puede observar que la eficiencia de transferencia a pneumococos es superior a la obtenida para los otros huéspedes. No hay diferencias significativas entre pLS1 y pLS5 para *S.pneumoniae* o *E.coli*. Sin embargo, pLS5 transforma *B.subtilis* con una eficiencia unas 40 veces mayor que pLS1. Ya que los multímeros son las únicas formas plasmídicas capaces de transformar eficientemente esta especie, una mayor frecuencia de transformación podría deberse a una proporción incrementada de formas multiméricas en la preparación de DNA utilizada. Este no parecía ser el caso, puesto que pLS5 presentaba igual proporción de multímeros que pLS1 en las preparaciones de DNA usadas en estos experimentos. Tampoco se observaron diferencias en la proporción de formas multiméricas al analizar, mediante hibridación de Southern, extractos crudos de pneumococos conteniendo pLS1 o pLS5. Otros plásmidos afectados por la deleción de pLS5 también presentan, como se verá más adelante, esta incrementada eficiencia de transferencia a *B.subtilis*, aunque de momento no tenemos explicación para este hecho. Análogamente a lo observado para pLS5, el plásmido pMV158 presenta eficiencias de transferencia similares a las de pLS1 en *S.pneumoniae* y en *E.coli*, pero no así en *B.subtilis*, donde la frecuencia de transformación de pMV158 es unas 5 veces superior a la de su derivado (estos resultados no se muestran). En este caso, las diferencias podrían deberse a la presencia, en el fragmento EcoRI B de pMV158 (el que se eliminó durante la construcción de pLS1), de un *ori*(-) de replicación muy eficiente en *B.subtilis* (región BA3; van der Lelie y cols, 1989; véase Discusión). Otras estirpes de *S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli* utilizadas en este trabajo (Tabla 1) dieron eficiencias de transformación similares a las que aquí se relacionan.

De forma similar a lo que ocurre con la frecuencia de transformación, el número de copias de pLS1 y pLS5 (Tabla 3) es mayor en pneumococos que en los otros dos huéspedes. En las tres especies, el número de copias de pLS5 es aproximadamente

TABLA 3: Características de pLS1 y pLS5 en los tres huéspedes

Huésped	Eficiencias de transferencia			Número de copias		Selección ^a (μg Tc/ml)
	DNA (μg/ml)	u.f.c./ml		pLS1	pLS5	
		pLS1	pLS5			
<u>S.pneumoniae</u> 708	0.1	16000	21000	22±2	52±6	1
	1.0	40000	53000			
<u>B.subtilis</u> MB11	0.1	40	3800	4.5±0.7	9.5±1	10
	1.0	330	30500			
<u>E.coli</u> C600	0.1	2000	3000	3.7±0.5	6.4±1.4	10
	1.0	10000	12000			

(a) La selección aplicada fue la misma para pLS1 y pLS5

Las resistencias a Tc de las estirpes sin plásmido son inferiores a 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para *S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli*, respectivamente

el doble que el de pLS1. Por otro lado, pMV158 y pLS1 presentan valores similares en cuanto al número de copias tanto en pneumococos como en el huésped gram-negativo (los datos no se muestran). En *B.subtilis*, sin embargo, el número de copias de pMV158 es unas 3 veces mayor que el de su derivado pLS1, posiblemente debido a la presencia, en el primero de estos plásmidos, de la región BA3 (véase Discusión).

Debido a que conocíamos la secuencia completa del DNA de pLS1 (pero no la del fragmento EcoRI B de pMV158), y ya que las características fenotípicas de ambos plásmidos eran indistinguibles en pneumococos, este trabajo se ha centrado en el estudio de pLS1 y de sus derivados, y sólo ocasionalmente hemos utilizado el plásmido parental pMV158. Las células conteniendo pLS1 o pLS5 fueron seleccionadas y crecidas, en cada especie, a la concentración indicada de Tc (Tabla 3), la misma para ambos plásmidos. En el caso del determinante *tet* de estos plásmidos no hay una relación directa entre dosis génica (número de copias) y máxima resistencia a Tc. Es más, el producto del gen *tet* parece tóxico para las células, y números de copia muy elevados provocan pérdida de la viabilidad celular.

Ya que pLS1 y pLS5 podían establecerse y mantenerse con presión de selección en una variedad de huéspedes, era también interesante conocer su estabilidad y si ésta

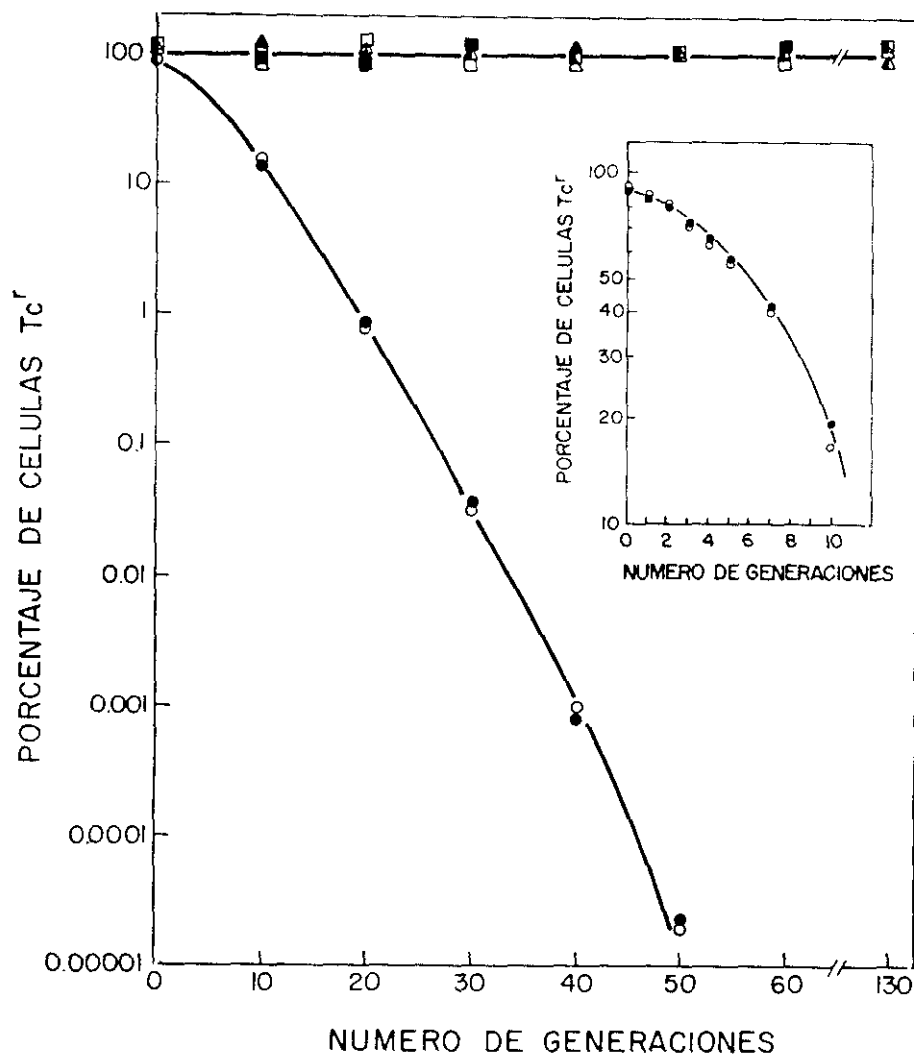


Figura 9. Estabilidad de pLS1 y pLS5 en *S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli*. La proporción de células con plásmido en cultivos creciendo exponencialmente se determinó como el porcentaje de células Tc^r. Símbolos: vacíos, cultivos con pLS1; llenos, cultivos con pLS5; triángulos, *S.pneumoniae*; cuadrados, *B.subtilis*; círculos, *E.coli*. En el recuadro interior se muestra la pérdida de pLS1 y pLS5 en cultivos de *E.coli* durante las diez primeras generaciones.

estaba relacionada con el número de copias del plásmido en cada especie. Para ello, realizamos tests de estabilidad tomando muestras de los cultivos cada 10 generaciones y analizando el porcentaje de células que conservaban el plásmido. Después de 130 generaciones en ausencia de selección, no observamos la aparición de células sin plásmido en cultivos de pneumococos conteniendo pLS1 o pLS5 (Fig. 9). Este tipo de análisis, realizado en *B.subtilis* MB11 durante 130 generaciones, demostró que pLS1 y pLS5 son también estables en esta bacteria (Fig. 9). Curiosamente, en *E.coli* C600 ambos plásmidos son muy inestables, a pesar de presentar un número de copias aproximadamente igual al observado en *B.subtilis* MB11. En el huésped gram-negativo, pLS1 y pLS5 se pierden tan rápidamente que, tras 40 generaciones en medio no selectivo, sólo alrededor de un 0.001% de las células contiene estos plásmidos (Fig. 9). Teniendo en cuenta este valor y el porcentaje inicial de células con plásmido (90%), se podría estimar en 0.25 la tasa

de pérdida por célula y generación (L_{ex}). Sin embargo, la curva obtenida en la Figura 9 indicaría que la tasa de pérdida no se mantiene constante, sino que la disminución en la población que lleva plásmido se acelera cuando se incrementa la fracción de la población que ha perdido el plásmido. Se ha descrito que esta aceleración se debería a una menor tasa de crecimiento de las células que llevan plásmido con respecto a las que lo han perdido (Nordström y cols, 1980a). En este sentido, volvemos a mencionar la toxicidad del gen *tet*, observada a lo largo de este trabajo, y especialmente en *E.coli* (se verá más adelante). Para poder estimar más correctamente la tasa de pérdida debida a partición, se determinó el porcentaje de células con plásmido cada generación, desde $g=0$ a $g=10$ (Fig. 9). De nuevo observamos una pérdida similar para ambos plásmidos, a pesar del mayor número de copias de pLS5, siendo 0.03 el valor estimado para L_{ex} en las primeras generaciones.

2. REPLICACION EN EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS.

Optimización del sistema.

Ya que pMV158 y sus derivados son capaces de establecerse y replicar en *E.coli*, aprovechamos el desarrollo en esta bacteria de sistemas *in vitro* (capaces de llevar a cabo todo el proceso de replicación semiconservativa de DNAs plasmídicos) para estudiar las características replicativas de estos plásmidos.

En primer lugar, optimizamos el sistema en lo que se refiere a preparación de los extractos acelulares, temperatura y tiempo de reacción, así como concentración de DNA exógeno añadido al ensayo, para conseguir la máxima replicación de pMV158 y sus derivados. Simultáneamente se ensayaron los plásmidos pKN182 (miniderivado de R1) y ColE1 como controles de la capacidad replicativa del sistema para plásmidos que requieren o no, respectivamente, la síntesis *de novo* de proteínas. Para estos estudios previos, los extractos fueron preparados a partir de cultivos de la estirpe C600 sin plásmido endógeno. Los cultivos (crecidos en las condiciones descritas en el apartado 16 de Métodos) se recogieron al alcanzar unas DO de 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 0.9, 1.35 y 1.5. Los rendimientos celulares (g/l; peso húmedo) correspondientes a estas DO fueron de 1.4, 1.8, 2.1, 2.7, 3.1, 4.6 y 5.2, respectivamente. A partir de estos cultivos se prepararon extractos en los que se ensayó la replicación del DNA de los distintos plásmidos, utilizando 1 μ g de DNA molde para cada ensayo (25 μ l de volumen total) y la cantidad

de extracto necesaria para obtener una concentración final de proteínas de unos 15 mg/ml. Según pudimos comprobar, la actividad replicativa de los extractos sobre los DNAs ensayados no varía apenas en un rango de concentración de proteínas entre 10 mg/ml y 30 mg/ml. En este sentido, se ha observado para el sistema de replicación *in vitro* de ColE1 que la incorporación de dTMP se nivela a una concentración de proteínas cercana a 15 mg/ml, y sólo ocasionalmente se observa una inhibición de la síntesis de DNA a concentraciones mucho más altas (Staudenbauer, 1984). La Figura 10 muestra la relación entre la fase de crecimiento a la cual se prepararon los extractos y la capacidad de los mismos para sintetizar DNA plasmídico. Para ColE1 se observa una alta eficiencia de síntesis, casi no influenciada por la fase de crecimiento. Sin embargo, la capacidad de los extractos para sintetizar DNA de pMV158, pLS1 y pLS5 depende estrictamente de la fase de crecimiento a la cual se recogen las células. La máxima eficiencia de síntesis corresponde a un rendimiento celular de aproximadamente 1.8 g/l (DO = 0.5), que se alcanza 25 min antes del final de la fase de crecimiento exponencial. Las condiciones para la síntesis de DNA del plásmido pKN182 son menos estrictas, aunque se detecta una brusca disminución en la actividad de los extractos preparados a partir de cultivos con un rendimiento celular mayor de 5 g/l. Las diferencias observadas entre ColE1 y los otros

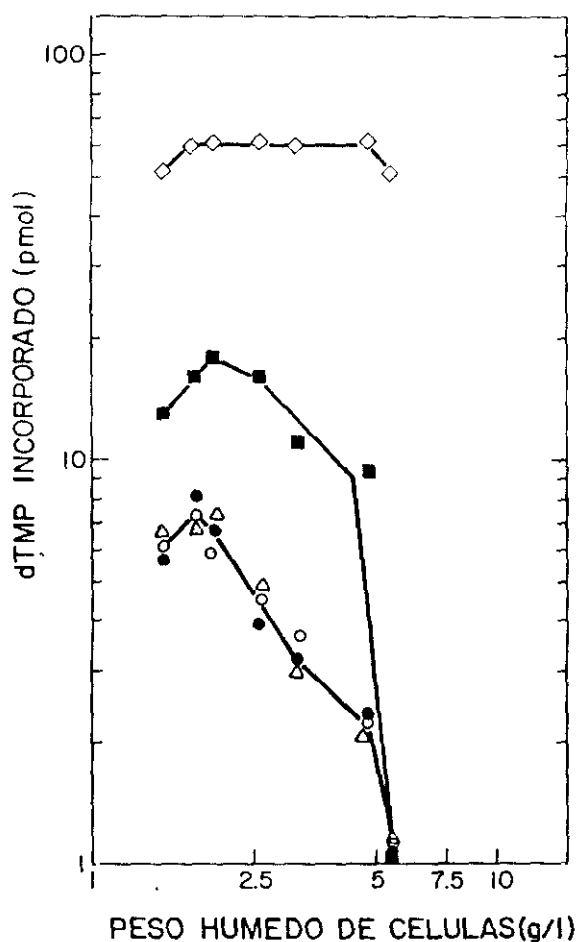


Figura 10. Relación entre fase de crecimiento celular y actividad replicativa de extractos de *E. coli* C600. Se crecieron cultivos hasta diferentes DO y se recogieron las células, determinándose su peso húmedo. A partir de cada cultivo se prepararon extractos y se ensayó su capacidad replicativa. La concentración de proteínas se normalizó para todos los extractos. Los DNAs plasmídicos cuya replicación se analizó fueron: ColE1 (◇), pKN182 (■), pMV158 (Δ), pLS1 (○) y pLS5 (●).

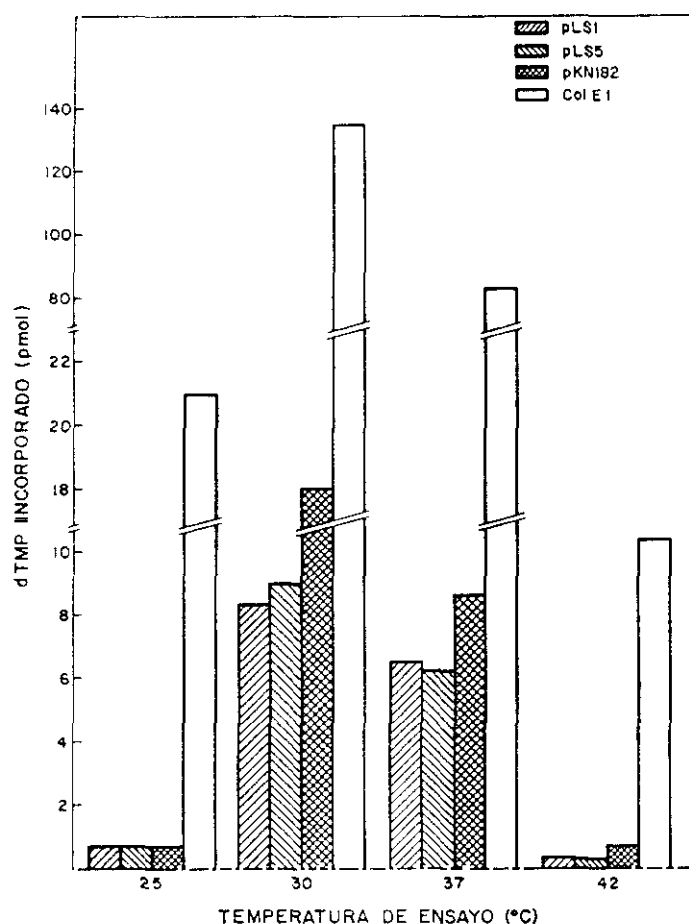


Figura 11. Relación entre temperatura a la que se realiza el ensayo de replicación y eficiencia de incorporación de dTMP en los distintos DNAs plasmídicos.

plásmidos probados podrían estar reflejando distintos mecanismos de replicación de cada uno de ellos.

Utilizando extractos preparados a partir de cultivos crecidos hasta una DO de 0.5, determinamos, a continuación, la temperatura óptima de realización de estos ensayos. Para todos los plásmidos estudiados, la máxima actividad replicativa tiene lugar a 30°C (Fig. 11). A 37°C se observa una reducción del 50% en la actividad de los extractos para replicar pKN182, mientras que para el resto de los plásmidos esta reducción es sólo del 30%, aproximadamente. Cuando los ensayos de replicación se realizan a 25°C o 42°C, sólo se detecta actividad para ColE1, observándose, sin embargo, una reducción del 90% con respecto a la cantidad de dTMP incorporada a 30°C.

La cinética de síntesis del DNA de los plásmidos de estreptococos (Fig. 12) muestra que la incorporación de dTMP es lineal durante los primeros 60 min y que la curva se nivela tras unos 75 min de incubación a 30°C debido, probablemente, a inactivación térmica. Dado que no se observó pérdida del dTMP incorporado, ni siquiera

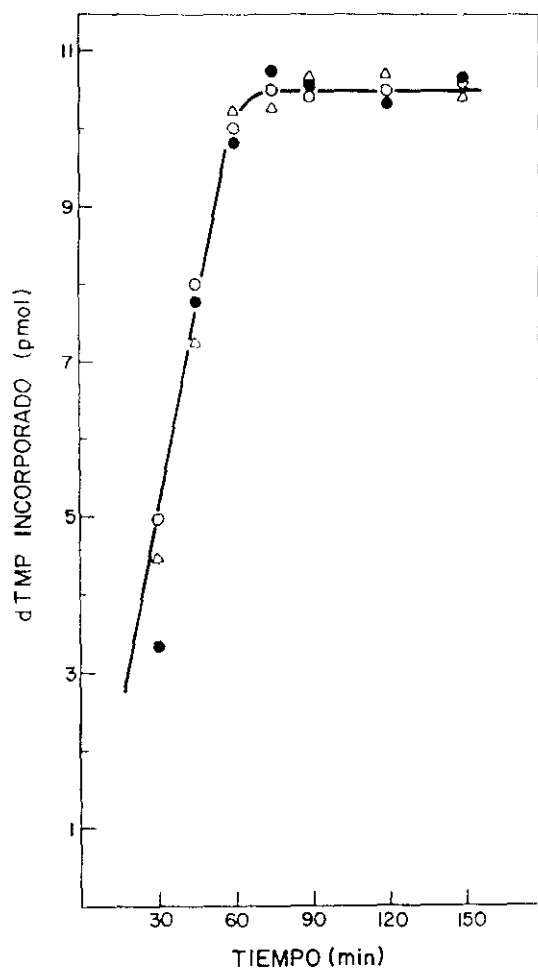


Figura 12. Cinética de incorporación de dTMP. La síntesis de DNA se ensayó por incubación de mezclas de reacción estándar a 30°C. A los tiempos indicados se determinó la radiactividad insoluble en ácido en los extractos. Símbolos: pMV158 (Δ); pLS1 (○); pLS5 (●).

en incubaciones mucho más largas (hasta 150 min), escogimos 120 min como tiempo de incubación de las mezclas de reacción. Con ello se asegura una incorporación máxima, aún en el caso de que la tasa de síntesis del DNA estuviera algo disminuida en nuevas preparaciones de extractos.

Por último, la influencia de la concentración del DNA molde sobre la incorporación de dTMP para los plásmidos objeto de este trabajo se muestra en la Figura 13. La concentración óptima es, en todos los casos, 1 μg de DNA para los 25 μl de mezcla de reacción (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A mayores concentraciones de DNA se observa una inhibición en la incorporación de dTMP. Un efecto similar se ha observado para los plásmidos de *E.coli* R6K (Inuzuka y Helinski, 1978) y miniderivados de R1 (Díaz y cols, 1981), así como para el plásmido de amplio espectro de huésped RSF1010 (Díaz y Staudenbauer, 1982). Por el contrario, la replicación de ColE1 casi no se ve afectada cuando se incrementa la concentración del DNA por encima del valor óptimo (Díaz y Staudenbauer, 1982). La inhibición (específica de replicón) por altas concentraciones de DNA podría deberse a la dispersión de uno o más factores de replicación unidos al DNA, sugiriendo que cada

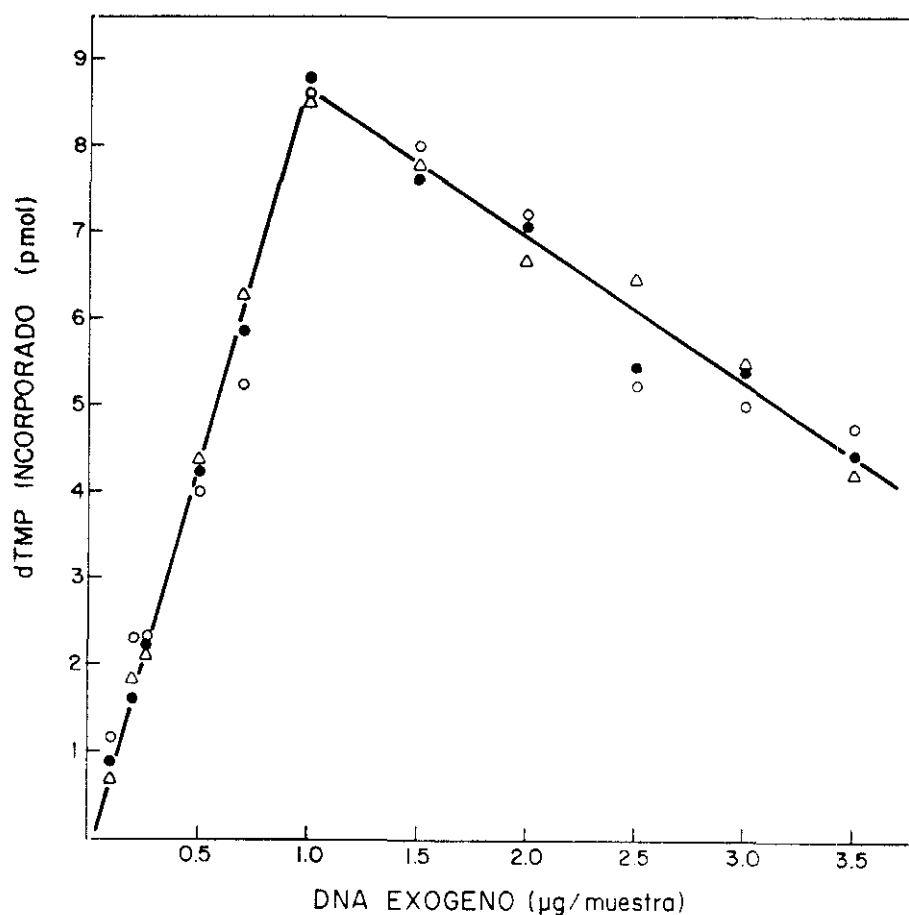


Figura 13. Influencia de la concentración de DNA sobre la eficiencia de replicación. Se prepararon mezclas de reacción estándar (25 µl) conteniendo distintas cantidades de DNA de pMV158 (Δ), pLS1 (○) o pLS5 (●), y se incubaron a 30°C durante 120 min, antes de determinar los pmoles de dTMP incorporados en cada caso.

origen plasmídico funcional necesitaría más de una molécula de dichos factores.

De lo expuesto hasta ahora se desprenden las condiciones de ensayo óptimas para la replicación *in vitro* de los plásmidos de estreptococos: incubación, a 30°C durante 120 min, de mezclas de reacción que contengan 1 µg de DNA plasmídico y la cantidad adecuada de extracto preparado a partir de cultivos crecidos hasta una DO de 0.5. A no ser que se indique otra cosa, éstas han sido las condiciones empleadas en los experimentos de replicación que se describirán a continuación.

Aunque en todos los ensayos habíamos observado los mismos niveles de incorporación de dTMP para pLS1 y pLS5 (Figs. 10-13), no podíamos descartar *a priori* que ambos plásmidos presentaran distintas propiedades de replicación en el sistema *in vitro*, ya que *in vivo* el número de copias era diferente. Por esta razón, una vez optimizado el sistema, los siguientes ensayos se realizaron con el DNA de los plásmidos pLS1 y pLS5.

Características del sistema en extractos que no contienen plásmido endógeno.

Para caracterizar el sistema de replicación *in vitro* de los plásmidos de estreptococos, hemos estudiado el efecto de varios agentes sobre la incorporación de dTMP en el DNA de dichos plásmidos. Los mismos experimentos los realizamos, como controles, con los DNAs de pKN182 y ColE1, replicones cuyos requerimientos en el sistema *in vitro* son bien conocidos (Staudenbauer, 1984). Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 4. En ausencia de cualquier inhibidor hay unos niveles similares de incorporación de dTMP para los tres plásmidos de estreptococos, no observándose diferencias significativas entre pLS1 o pMV158 y el mutante de doble número de copias pLS5. Ya que la síntesis de DNA puede ser replicativa o reparadora, era importante distinguir, en primer lugar, cuál de estos dos procesos tenía lugar en nuestro sistema. En este sentido, se ha establecido que la replicación plasmídica es, en general, muy sensible a inhibidores de la DNA girasa, los cuales no afectan a la reparación del DNA (Staudenbauer, 1984). Sin embargo, Khan y cols (1981) han descrito que la replicación *in vitro* del DNA del plásmido pT181 sólo es inhibida en un 50% por adición de Nov (inhibidor de la DNA girasa). Así, en tanto que una inhibición parcial de la síntesis de DNA por Nov no permite distinguir claramente entre reparación o replicación similar a la descrita para pT181, una inhibición total no deja lugar a dudas acerca del carácter replicativo de la incorporación. Para todos los plásmidos relacionados

TABLA 4: Efecto de varios inhibidores sobre la síntesis de DNA plasmídico en extractos sin plásmido endógeno

Inhibidor	Concentración del inhibidor ($\mu\text{g/ml}$)	dTMP incorporado (pmoles) ^a en				
		pMV158	pLS1	pLS5	pKN182	ColE1
Ninguno	--	9.7	10.3	10.8	15.4	135.8
Cm	100	0.50	0.61	0.72	0.42	182.3
Rif	25	0	0.12	0.14	0.10	0.54
Nov	25	0.20	0.17	0.15	0.27	0.12
DNasa I ^b	10	0	0	0	0	0

(a) Cada valor es la media de, al menos, 4 experimentos independientes

(b) Los DNAs fueron digeridos con DNasa I antes de ser añadidos a las mezclas de reacción

en la Tabla 4 se observa que la incorporación de dTMP es bloqueada por adición de Nov. Esto prueba que, en el sistema *in vitro*, la síntesis de DNA de pMV158 y de sus derivados es un proceso replicativo, tal y como ha sido demostrado previamente para pKN182 y ColE1 (Díaz y cols, 1981; Staudenbauer, 1976). Cuando el DNA de los distintos plásmidos fue digerido con DNasa I, antes de su adición a la mezcla de incubación, la incorporación de dTMP se redujo a niveles de fondo, como corresponde a la degradación del molde de replicación. La inhibición de la síntesis de proteínas por Cm bloquea la replicación del DNA de los plásmidos ensayados, a excepción de ColE1. El efecto diferencial de la adición de este antibiótico sobre la replicación de pKN182 y ColE1 refleja los distintos mecanismos replicativos de estos plásmidos. Así, mientras la replicación de ColE1 depende completamente de la maquinaria del huésped, la de pKN182 requiere la presencia de la proteína iniciadora especificada por el plásmido. En el caso de la replicación de los plásmidos de estreptococos en este tipo de extractos, la estricta dependencia de la síntesis *de novo* de proteínas podría deberse al requerimiento de una función plasmídica o de una función inestable del huésped. La replicación del DNA de los plásmidos ensayados (Tabla 4) es totalmente sensible a la inhibición de la RNA polimerasa del huésped por Rif. Para el miniderivado de R1, este efecto es debido al bloqueo, a nivel transcripcional, de la síntesis de la proteína iniciadora, en tanto que para ColE1, el paso bloqueado es la formación del "primer". La sensibilidad a Rif de pMV158 y sus derivados podría responder a la necesidad de síntesis de proteínas y/o a la implicación de un RNA "primer" en la iniciación de la replicación.

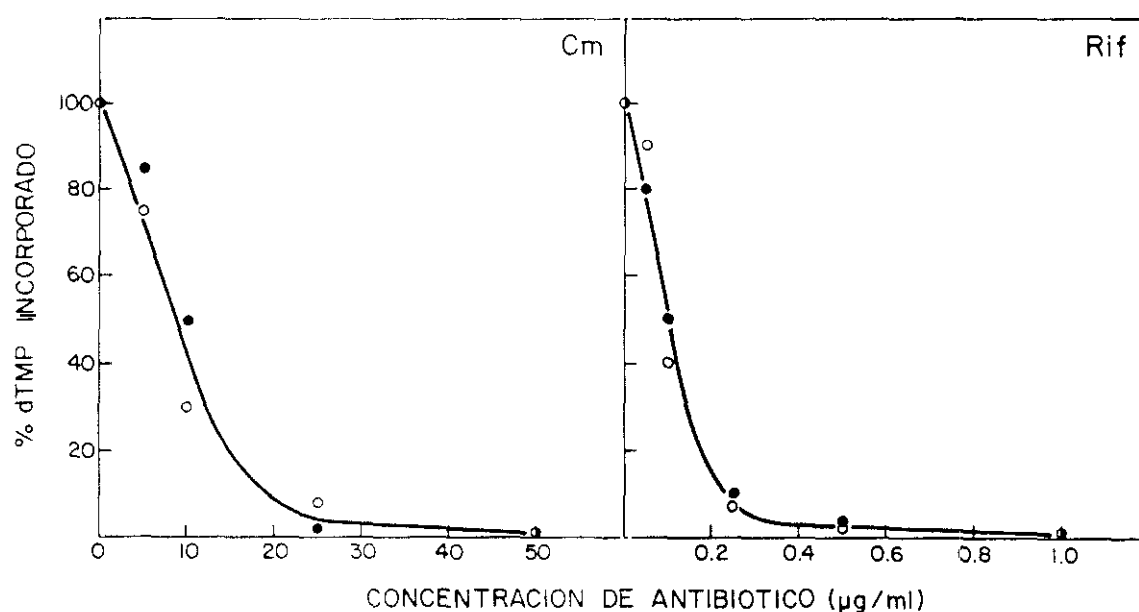


Figura 14. Inhibición de la síntesis replicativa del DNA de pLS1 (○) y pLS5 (●) por distintas concentraciones de Cm o Rif. El 100% de dTMP incorporado corresponde, en cada plásmido, al valor obtenido en ausencia de antibiótico.

De nuevo no encontramos diferencias entre pLS1 y pLS5 cuando analizamos el grado de inhibición de su replicación por distintas concentraciones de Cm o Rif (Fig. 14). A 25 $\mu\text{g/ml}$ de Cm, sólo se detecta una incorporación de dTMP residual (5%). Un grado similar de inhibición se observa con sólo 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de Rif, concentración que está muy por debajo de la empleada normalmente para los plásmidos ColE1 o miniderivados de R1 (Staudenbauer, 1976; Díaz y cols, 1981; Díaz y Ortega, 1984).

A lo largo de todos los ensayos de replicación con los plásmidos de estreptococos, observamos la importancia del superenrollamiento del DNA molde para una replicación eficiente. Muestras de DNA que, a lo largo de sucesivas congelaciones y descongelaciones, se habían enriquecido en formas OC, presentaban niveles muy disminuidos de incorporación de dTMP. Por esta razón, los DNAs plasmídicos purificados se conservaron a -70°C repartidos en alícuotas de 25 μl , cada una de las cuales sólo se descongeló 1 o 2 veces.

Características del sistema en extractos con plásmido endógeno.

Los plásmidos pMV158 y sus derivados pueden replicar *in vitro*, tanto en extractos preparados a partir de células sin plásmido (tal y como acabamos de mostrar), como en extractos preparados a partir de células con plásmido endógeno. El estudio comparativo de las características y requerimientos replicativos en ambos sistemas nos permitió clarificar el origen de algunas de las funciones necesarias.

Los extractos con plásmido endógeno muestran baja actividad replicativa si no se añade DNA plasmídico (Tabla 5), indicando que la concentración del DNA endógeno es demasiado baja para que tenga lugar una replicación eficiente. De hecho, teniendo en cuenta el número de células utilizado para preparar los extractos, el contenido en DNA plasmídico de las mismas y el volumen de extracto utilizado por ensayo, hemos estimado que la concentración de DNA endógeno es, en cualquier caso, inferior a 0.05 μg en los 25 μl de mezcla de reacción. A estos niveles de concentración de DNA molde no resulta extraña una incorporación de dTMP apenas detectable (Fig. 13). Cuando se añade 1 μg de DNA plasmídico para los 25 μl del ensayo, la síntesis de DNA se hace un orden de magnitud mayor. En estas condiciones, los niveles de replicación de pMV158 y sus derivados son similares a los observados para extractos libres de plásmido endógeno. Por el contrario, la replicación de los miniderivados de R1, aunque sucede en ambos tipos de extractos, es unas diez veces más eficiente en extractos con plásmido endógeno (Díaz y cols, 1981). Hay que señalar que, aunque en los ensayos mostrados en la Tabla 5 cada

TABLA 5: Efecto de antibióticos sobre la síntesis de DNA de los derivados de pMV158

Origen del extracto ^a	DNA añadido (1 µg/25 µl)	Incorporación de dTMP (%) ^b			
		Control	Rif (25µg/ml)	Cm (100µg/ml)	Nov (25µg/ml)
C600/pMV158	--	13.0	8.5	5.3	0
	pMV158	100	90.4	70.9	1.9
C600/pLS1	--	10.9	7.8	6.8	0
	pLS1	100	79.0	66.9	1.4
C600/pLS5	--	10.2	7.5	7.3	0
	pLS5	100	74.5	50.3	3.4
C600	pMV158	100	0	5.2	2
	pLS1	100	1.2	5.9	1.6
	pLS5	100	1.3	6.7	1.4

(a) Para los extractos con plásmido endógeno, se consideró como fondo el valor obtenido sin adición de plásmido y con Nov. Para los extractos sin plásmido, el fondo fue el valor obtenido cuando no se añadió DNA exógeno.

(b) El 100% de incorporación corresponde, en todos los casos, a valores entre 8 y 11 pmoles de dTMP incorporados.

uno de los DNAs plasmídicos se añadió a su extracto correspondiente, hemos encontrado niveles similares de incorporación de dTMP, independientemente de que el DNA añadido corresponda o no al DNA presente en los extractos. Como corresponde a una síntesis replicativa de DNA, la incorporación de dTMP es bloqueada por la adición de Nov. Para los extractos con plásmido endógeno, hemos considerado como fondo los niveles residuales de síntesis en ensayos en los que no se añadió DNA pero sí este antibiótico. La replicación observada en extractos con plásmido endógeno es resistente en gran medida (entre un 50% y un 70%) a la inhibición de la biosíntesis de proteínas por Cm, en tanto que en extractos preparados a partir de la estirpe C600, sólo se observan niveles residuales de síntesis de DNA (alrededor de un 6%) tras la adición de este antibiótico (Tabla 5). Este resultado sugiere que una o más de las proteínas requeridas para la replicación de estos plásmidos estarían presentes en los extractos con plásmido endógeno pero no en los extractos libres de plásmido, y que, por lo tanto, serían especificadas por pMV158 y sus derivados. Contrariamente a lo que sucede en extractos libres de plásmido, donde el

bloqueo de la síntesis de DNA exógeno por Rif es casi total (Tablas 4 y 5), la adición de este antibiótico a los extractos con plásmido endógeno resulta sólo en una pequeña inhibición de la síntesis de DNA (entre un 10% y un 25%). Además, esta inhibición por Rif es siempre menor que la causada por la adición de Cm (Tabla 5), indicando que la proteína (o proteínas) de replicación codificada por los plásmidos de estreptococos podría sintetizarse, al menos en parte, a través de una etapa que ya no requiere la RNA polimerasa. De esta forma, los mRNAs para dicha proteína, presentes en los extractos con plásmido endógeno, serían responsables de la replicación resistente a Rif pero sensible a Cm. Con estos resultados no podíamos excluir que la resistencia a Rif en este tipo de extractos se debiera, además de a la presencia de moléculas de proteína y mRNA, a que las moléculas de plásmido endógeno estuvieran ya primadas. En este caso, la máxima incorporación que esperaríamos cuando se inhibiera la síntesis *de novo* de RNA "primer" para el DNA añadido sería de aproximadamente un 8% (porcentaje correspondiente a la replicación del plásmido endógeno en presencia de Rif; Tabla 5), valor mucho más bajo que el observado. Por lo tanto, la escasa inhibición en presencia de Rif sugiere que la replicación *in vitro* de los plásmidos de estreptococos no requiere la síntesis de un RNA "primer" por la RNA polimerasa del huésped.

Análisis de los productos de reacción.

La incorporación de nucleótidos marcados en el DNA de pLS1 y pLS5 se analizó por electroforesis en geles de agarosa de los productos de reacción de los ensayos *in vitro*. El DNA se incubó con extractos preparados a partir de células sin plásmido, en presencia o ausencia de antibióticos. Después de 120 min a 30°C, el DNA fue recuperado de las mezclas de reacción y sometido a electroforesis y posterior autorradiografía o fluorografía (según hubiéramos empleado como precursor marcado [^{35}S]-dATP o [^3H]-dTTP, respectivamente). Los productos de reacción obtenidos cuando se utiliza [^{35}S]-dATP a 0.8 μM se muestran en la Figura 15. Tanto para pLS1 como para pLS5, la mayor parte de la marca se localiza, en las muestras no tratadas con antibióticos, en la posición correspondiente a las formas circulares relajadas (cerradas o abiertas). En la posición correspondiente a las formas ccc superenrolladas (que serían las esperadas como productos finales de la replicación) apenas se detecta radiactividad. Una parte significativa de la marca se encuentra repartida entre las posiciones correspondientes a las formas relajada y superenrollada de cada uno de los plásmidos y, en menor proporción, por encima de las formas relajadas. Esta serie de bandas corresponde, probablemente, a un conjunto de intermediarios replicativos, algunos de los cuales se acumularían

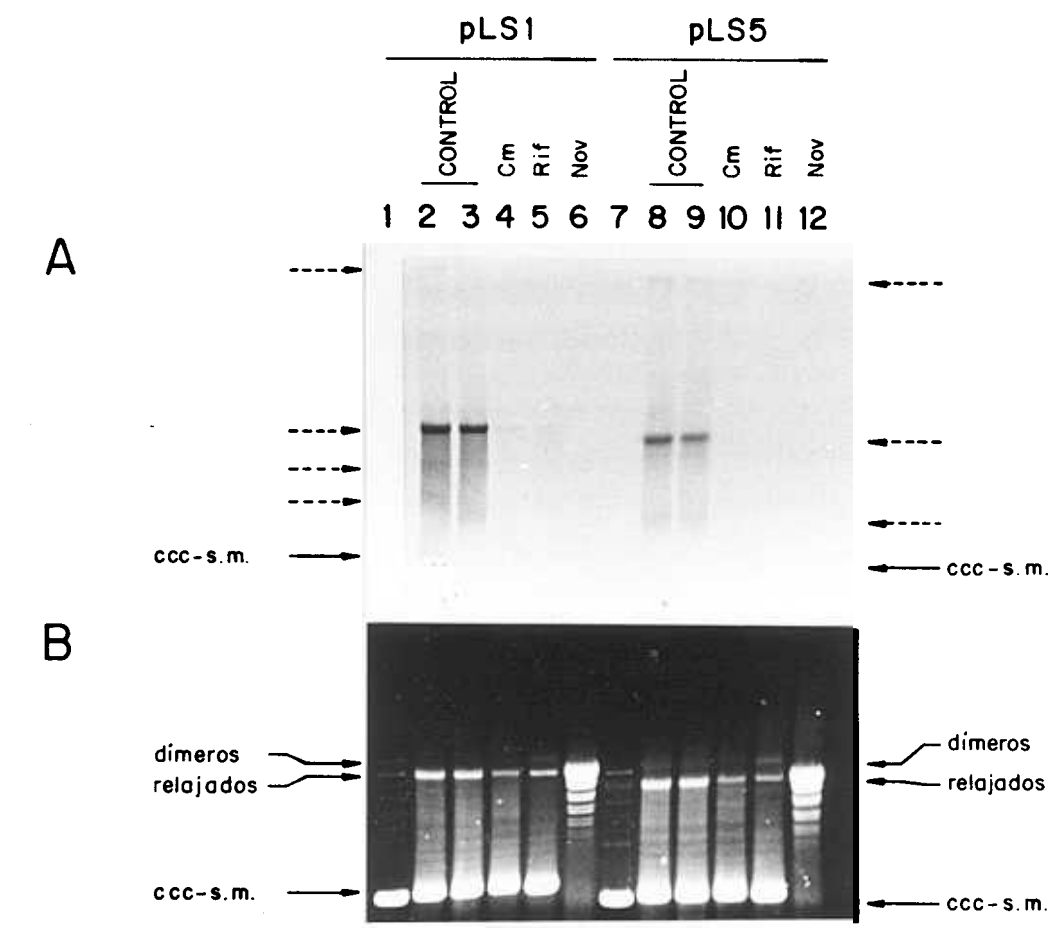


Figura 15. Análisis del DNA de pLS1 y pLS5 sintetizado *in vitro* cuando se usa [35 S]-dATP 0.8 μ M como precursor marcado. Se muestra el autorradiograma (A) del gel de agarosa teñido con EtBr (B). Calles 1 y 7, DNA purificado (1 μ g) de pLS1 y pLS5, respectivamente. El resto de las calles corresponde al DNA extraído de mezclas de reacción estándar tratadas con los antibióticos indicados, o no tratadas (Controles). Con flechas de trazo continuo se indica la posición de las formas ccc superenrolladas monoméricas (ccc-s.m.), relajadas y dimericas de ambos plásmidos. Las flechas de trazo discontinuo señalan la posición de probables intermediarios replicativos.

preferencialmente (Fig. 15). Cuando estos ensayos se realizaron utilizando como molde el DNA de pKN182 y ColE1, observamos una acumulación similar de posibles intermediarios (estos resultados no se muestran). Un amplio rango de intermediarios replicativos localizado entre las formas circulares superenrollada y relajada del DNA de pT181 ha sido observado como producto temprano de la replicación de este plásmido en el sistema *in vitro* (Khan y cols, 1981). Cuando se analizan los productos de la replicación de pLS1 y pLS5 en muestras tratadas con antibióticos (Cm, Rif o Nov) no se detectan bandas radiactivas, como corresponde al bloqueo causado por estos antibióticos sobre la incorporación de dTMP en material precipitable por ácido (Tablas 4 y 5). La incubación del DNA plasmídico exógeno en mezclas de reacción tratadas con Nov conduce a la conversión de formas superenrolladas del plásmido en formas con menor grado de

superenrollamiento (Fig. 15B, carriles 6 y 12), sin que se observe incorporación de marca radiactiva en DNA plasmídico (Fig. 15A, carriles 6 y 12).

La baja proporción de DNA de nueva síntesis en forma monomérica superenrollada, observada en los experimentos anteriores (Fig. 15, calles 2, 3 y 8, 9), nos hizo pensar que la presencia de un análogo radiactivo de dATP ($[^{35}\text{S}]\text{-dATP}$) podía estar ralentizando el proceso replicativo, de forma que se produjera una acumulación de intermediarios. En un intento de disminuir este efecto, analizamos los productos de la replicación del DNA de pLS5 en ensayos en los que la concentración de $[^{35}\text{S}]\text{-dATP}$ fue disminuida a $0.4\ \mu\text{M}$, sin variar la concentración de dATP frío ($25\ \mu\text{M}$). En estas condiciones (Fig. 16), el DNA plasmídico recién sintetizado se acumula principalmente como formas circulares relajadas, aunque se detectan también cantidades significativas de DNA monomérico superenrollado, en tanto que disminuye la proporción del DNA marcado localizado entre las formas relajadas y supetenrollada. Como es de esperar, la adición de antibióticos impide la aparición de DNA de nueva síntesis.

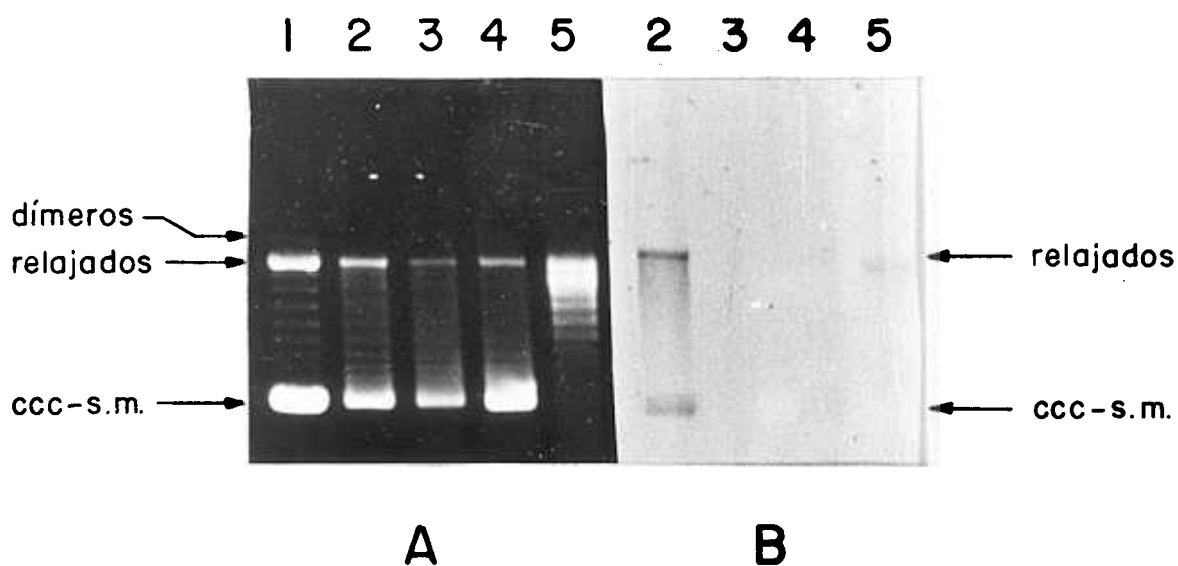


Figura 16. Análisis del DNA de pLS5 sintetizado *in vitro* cuando se usa $[^{35}\text{S}]\text{-dATP}$ $0.4\ \mu\text{M}$ como precursor marcado. A, gel de agarosa teñido con EtBr. B, autorradiograma del mismo gel. Calle 1, DNA de pLS5 purificado ($1\ \mu\text{g}$). Calles 2 a 5, DNA extraído de mezclas de reacción estándar no tratadas con antibiótico (calle 2), y tratadas con Cm (calle 3), Rif (calle 4) o Nov (calle 5). ccc-s.m., DNA ccc superenrollado monomérico.

Cuando se utiliza como precursor marcado [^3H]-dTTP en lugar de [^{35}S]-dATP, el producto principal de la replicación de pLS1 y pLS5 es DNA monomérico superenrollado, y su síntesis es inhibida por antibióticos (Fig. 17). La cuantificación de la radiactividad en los geles muestra que, en ausencia de antibióticos, un 80%-90% del marcaje incorporado a DNA se localiza en la posición correspondiente a las formas ccc superenrolladas, y que la marca en esta posición se reduce a un 30% o a un 5% cuando se emplea como precursor [^{35}S]-dATP a unas concentraciones de $0.4\ \mu\text{M}$ o $0.8\ \mu\text{M}$, respectivamente.

Podemos concluir, pues, que el producto final de nueva síntesis de la replicación de pLS1 y pLS5 en el sistema *in vitro* de *E.coli* consiste en DNA monomérico superenrollado, sugiriendo que debe haberse completado, al menos, una ronda de replicación.

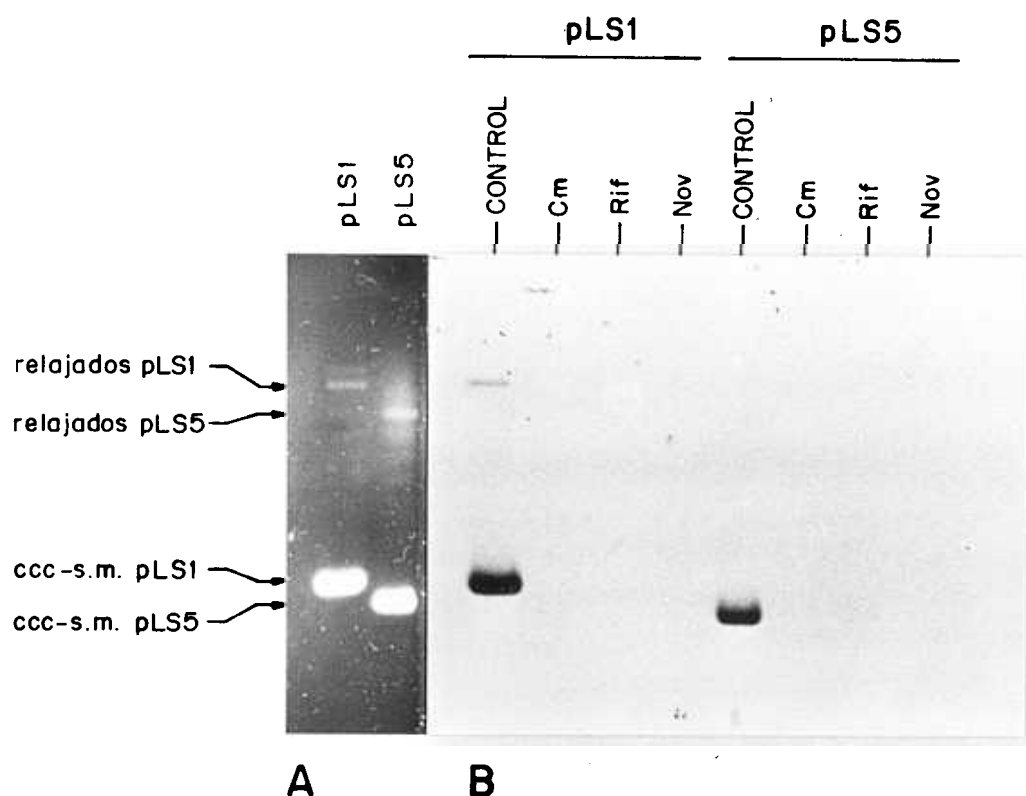


Figura 17. Análisis de los productos obtenidos en la replicación *in vitro* del DNA de pLS1 y pLS5 al usar [^3H]-dTTP como precursor marcado. A, fragmento de gel teñido con EtBr en el que se cargó $1\ \mu\text{g}$ de DNA puro para posicionar las distintas formas plasmídicas. B, fluorograma del fragmento restante del mismo gel, en el que se ha corrido el DNA extraído de mezclas de reacción estándar no tratadas con antibióticos (controles), o tratadas según se indica. ccc-s.m., DNA ccc superenrollado monomérico.

3. ORIGEN Y DIRECCION DE REPLICACION DE LA CADENA LIDER.

Localización del sitio de iniciación, y determinación de la dirección de replicación del DNA de pLS1 en el sistema *in vitro*.

El desarrollo de un sistema de replicación *in vitro* (cuyo producto final es DNA monomérico superenrollado; Figs. 17 y 18A) nos permitía analizar el sitio de iniciación y la dirección de la replicación del DNA de pLS1 mediante la terminación prematura de la síntesis de DNA por incorporación de ddTTP (Conrad y cols, 1979; Khan y cols, 1982).

Estos experimentos se realizaron con extractos libres de plásmido endógeno y utilizando como sustrato DNA monomérico superenrollado de pLS1. En estas condiciones, la iniciación de la replicación puede considerarse prácticamente sincrónica. Así, a partir de mezclas de reacción que contengan diferentes concentraciones del inhibidor ddTTP se pueden aislar familias de moléculas que hayan iniciado, pero no completado, una ronda de replicación. La digestión de estas moléculas con enzimas de restricción y la determinación de la radiactividad específica de los distintos fragmentos revelaría el orden de replicación de los mismos y la localización del sitio de iniciación. Con este fin, se prepararon mezclas de reacción que contenían [³H]-dTTP 25 μ M y 1 μ g de DNA de pLS1, y se incubaron a 30°C durante 120 min en ausencia de ddTTP, o con varias concentraciones del inhibidor (5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 60 μ M, 150 μ M y 330 μ M). Cada ensayo se realizó por duplicado y, una vez finalizada la reacción, uno de los lotes se utilizó para cuantificar la síntesis de DNA. La incorporación del precursor radiactivo a DNA plasmídico fue, para las distintas concentraciones de ddTTP, un 65%, 51%, 26%, 16%, 11% y 5% de la máxima síntesis obtenida en ausencia del inhibidor. El DNA del segundo lote de ensayos fue extraído de las mezclas de reacción, digerido con *Hinf*I y sometido a electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 18B y C se muestran, respectivamente, la fotografía del gel teñido con EtBr y el fluorograma del mismo gel. En este último se observa que la movilidad electroforética de cada uno de los fragmentos con DNA de nueva síntesis es la misma a cualquier concentración de ddTTP, y que esta movilidad es igual que la que presentan los fragmentos correspondientes de moléculas que no han replicado. En este sentido hay que señalar que el patrón de restricción observado en el gel teñido con EtBr correspondería casi exclusivamente a moléculas no replicadas, pues teniendo en cuenta la cantidad de DNA añadido como molde (1 μ g), la incorporación media de dTMP en ensayos no inhibidos (10 pmoles), y la proporción de este nucleótido en el DNA de pLS1 (31%), se puede deducir que las moléculas replicadas

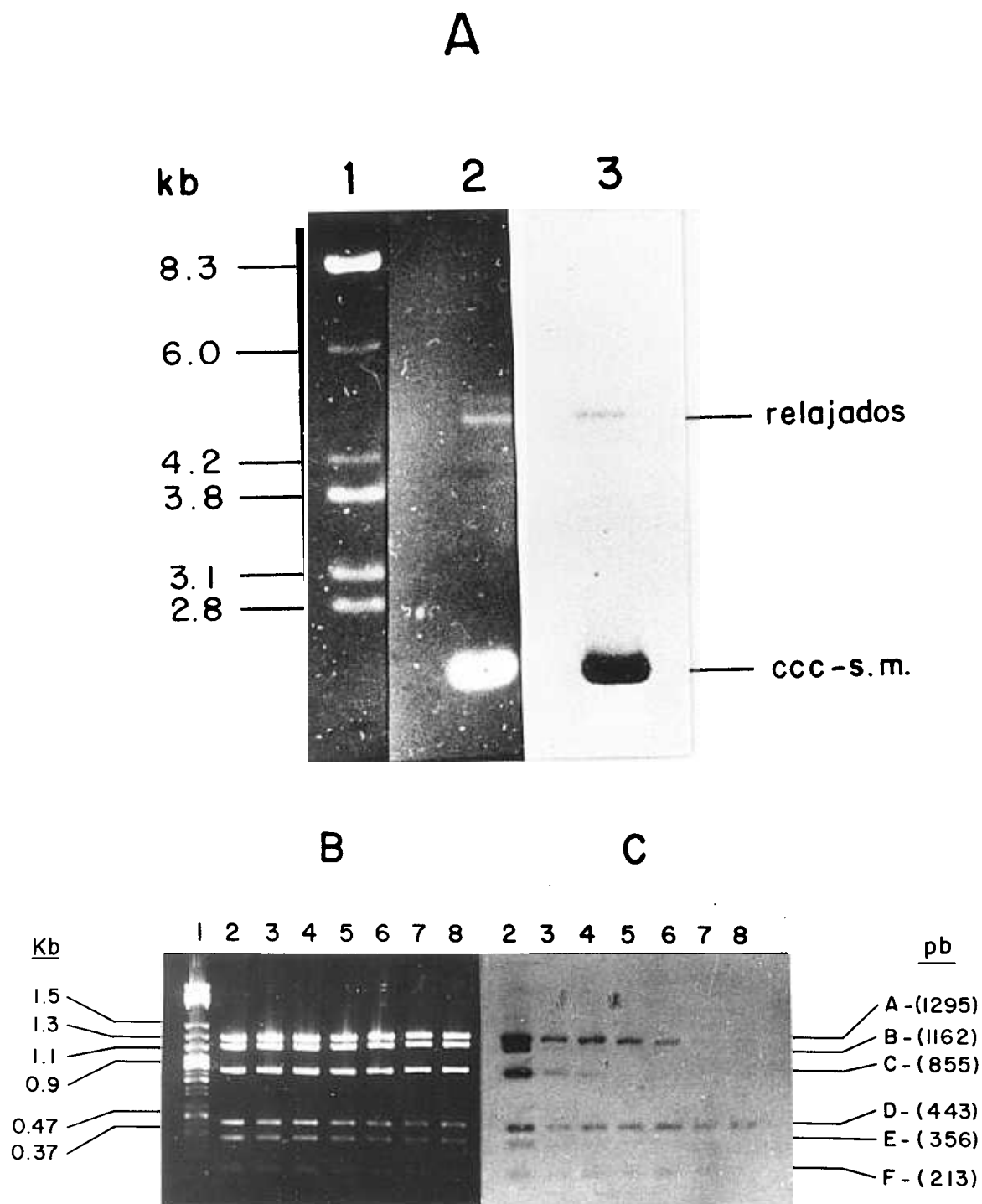


Figura 18. Localización del origen y dirección de la replicación *in vitro* de pLS1. A, productos finales de la replicación del DNA de pLS1 en ausencia de inhibidores: el DNA extraído de mezclas de reacción estándar se sometió a electroforesis en gel de agarosa; en las calles 2 y 3 se muestran, respectivamente, el gel teñido con EtBr y el fluorograma del mismo (ccc-s.m., DNA ccc superenrollado monomérico); como marcador de tamaño molecular se corrió el DNA del fago T7 digerido con *Mbo*I (calle 1), indicándose a la izquierda el tamaño de los fragmentos obtenidos. B y C, análisis de los fragmentos *Hinf*I del DNA procedente de ensayos en los que el DNA de pLS1 fue replicado en presencia de varias concentraciones de ddTTP: 0 μ M (calle 2); 5 μ M (calle 3); 10 μ M (calle 4); 25 μ M (calle 5); 60 μ M (calle 6); 150 μ M (calle 7) y 330 μ M (calle 8). B, gel teñido con EtBr; como marcador de tamaño molecular se usó el DNA de T7 digerido con *Hpa*II (calle 1), indicándose a la izquierda el tamaño de los fragmentos. C, fluorograma del mismo gel. A la derecha se indican los tamaños de los fragmentos *Hinf*I del DNA de pLS1. Nótese que el fragmento G (84 pb) se ha salido del gel.

representan, como más, el 2% del total. Cuando se compara la marca específica de los distintos fragmentos de restricción, se observa que el fragmento Hinfi D de 443 pb es el único en el que se aprecia marca a la concentración de ddTTP más elevada (Fig. 18C, carril 8), indicando que la replicación comienza en este fragmento. El orden secuencial de marcaje continúa con los fragmentos F (213 pb), A (1295 pb), C (855 pb), E (356 pb) y B (1162 pb). En consecuencia, el orden de replicación sería DFACE(G)B, teniendo en cuenta que el fragmento G (84 pb) ha salido del gel. Estos resultados *in vitro* demuestran que el DNA de pLS1 es replicado unidireccionalmente en la misma dirección que la síntesis de los propuestos mRNAs plasmídicos (Lacks y cols, 1986), es decir en el sentido de las agujas del reloj según se representa el mapa circular de pLS1 (Fig. 19). En ausencia de ddTTP (Fig. 18C, carril 2), la intensidad de los fragmentos A y B (de tamaño similar pero cronológicamente distantes en la replicación) es casi igual, indicando que la mayoría de las moléculas que han iniciado una ronda de replicación la han completado, tal y como sugería la aparición de monómeros superenrollados como productos finales de la replicación *in vitro* (Fig. 18A). Dado que el fragmento en el que se inicia la replicación (Hinfi D) tiene la misma movilidad electroforética con independencia de que proceda o no de moléculas parcialmente replicadas, parece que durante la replicación del DNA

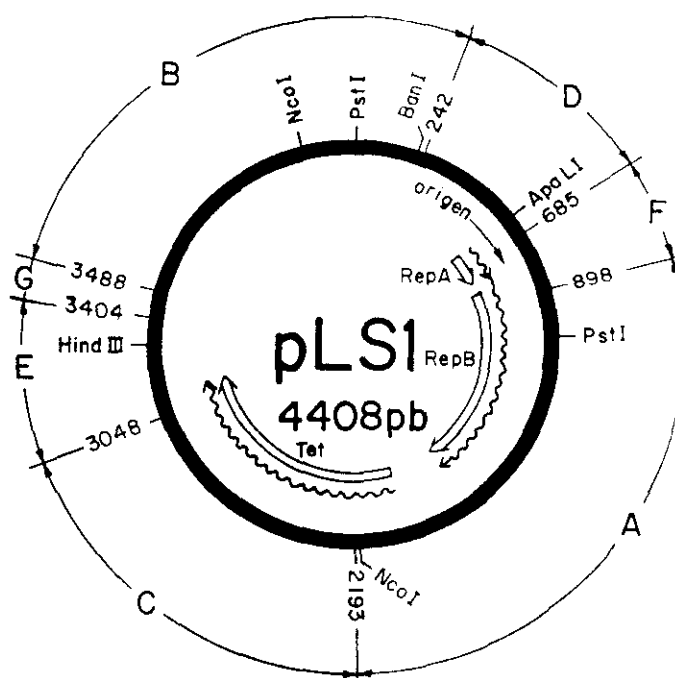


Figura 19. Localización de los fragmentos Hinfi sobre el mapa de pLS1. Los números indican las coordenadas de los sitios de corte por Hinfi. Las letras en la parte más exterior hacen referencia a los diversos fragmentos Hinfi, nombrados alfabéticamente en orden decreciente de tamaño. Otros sitios de restricción relevantes también se muestran. En el interior se indican el origen y la dirección de replicación de pLS1, según se deduce de los ensayos *in vitro*. Se muestra, asimismo, la dirección de transcripción de los genes que codifican los tres productos proteicos de pLS1 (RepA, RepB y Tet).

de pLS1 no se generan moléculas ahorquilladas. Intermediarios en forma de horquilla han sido observados en el sistema *in vitro* del plásmido RSF1030, cuya replicación tiene lugar mediante un mecanismo tipo Θ (Conrad y cols, 1979). Por el contrario, para pT181, la ausencia de estos intermediarios ha sido considerada como una indicación de que la replicación de este plásmido se lleva a cabo por un mecanismo de círculo rodante (Khan y cols, 1982). Los resultados obtenidos con pLS1 apuntarían, pues, a este tipo de mecanismo replicativo. Si éste estaba teniendo lugar realmente *in vivo*, deberíamos ser capaces de detectar formas plasmídicas monocatenarias, intermediarios en este tipo de replicación.

Intermediarios de cadena sencilla generados durante la replicación *in vivo* del DNA de pLS1.

El DNA plasmídico de cadena sencilla se puede detectar en extractos celulares totales por tres criterios: a) tiene una movilidad electroforética mayor en geles de agarosa que la de las formas monoméricas de doble cadena ccc superenrolladas; b) se une a filtros de nitrocelulosa sin necesidad de desnaturalización previa y c) es totalmente sensible a nucleasa S1 (te Riele y cols, 1986b). El análisis del DNA monocatenario generado en células de *S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli* que llevan pLS1 (utilizando como sonda DNA de pLS1 marcado mediante el método de extensión de cebadores), muestra la presencia de DNA plasmídico de rápida migración y sensible a nucleasa S1, que es transferido a nitrocelulosa sin necesidad de desnaturalización previa (Fig. 20). La cantidad de DNA de cadena sencilla es mucho menor en *S.pneumoniae* que en los otros dos huéspedes, a pesar de que el número de copias de pLS1 es, aproximadamente, 22 en pneumococos y 4 en *B.subtilis* y *E.coli*. Esto demuestra que la conversión de ssDNA a dsDNA es más eficiente en pneumococos que en las otras dos bacterias.

En un mecanismo de círculo rodante sólo una de las dos hebras del DNA actúa como cadena (+) y es desplazada para generar moléculas monocatenarias (Fig. 1). Por lo tanto, si las moléculas de ssDNA de pLS1 detectadas en las tres especies son realmente intermediarios de este tipo de mecanismo replicativo, deberían corresponder exclusivamente a una de las cadenas del DNA, cuya identificación revelaría, además, la dirección de replicación de la cadena (+) *in vivo*. Con el fin de probar este supuesto y para aumentar la capacidad de detección de las formas monocatenarias, preparamos y analizamos extractos crudos de pneumococos que contenían pLS1_{cop7} (mutante de pLS1 que presenta un incremento de unas 5 veces tanto en el número de copias de dsDNA

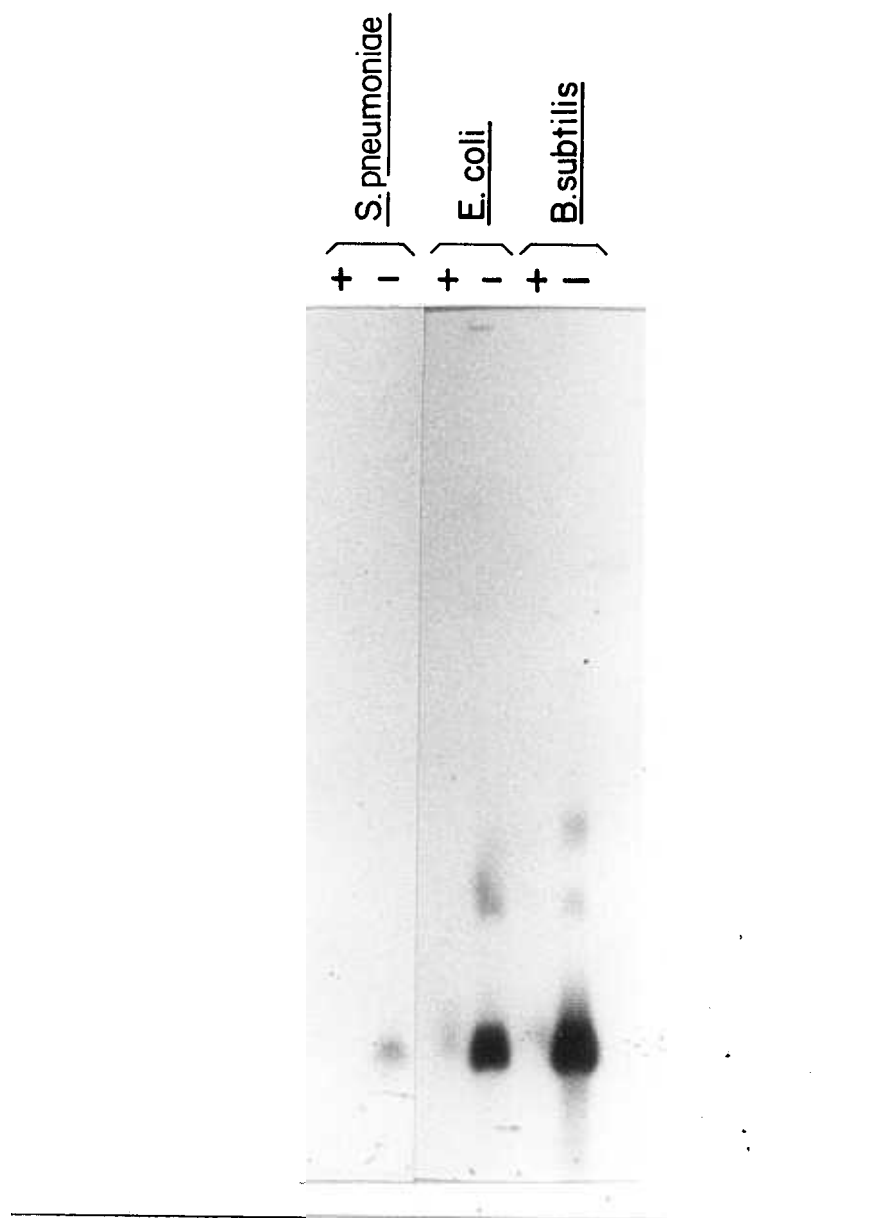


Figura 20. DNA monocatenario de pLS1 acumulado en *S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli*. Los lisados celulares fueron tratados (+) o no (-) con nucleasa S1 antes de la electroforesis y transferencia (sin desnaturalización del DNA) a filtros de nitrocelulosa.

como en la cantidad de ssDNA acumulada) o pLS4 (derivado delecionado de pLS5 que acumula gran cantidad de formas monocatenarias). Dos muestras de cada preparación de extractos se sometieron a electroforesis (Fig. 21A) y el DNA se transfirió, sin desnaturalización previa, a filtros de nitrocelulosa. El DNA transferido de cada una de las muestras se hibridó con una u otra de las cadenas del fragmento HinFI F de pLS1 marcadas radiactivamente (pruebas Fa y Fb, respectivamente). Para preparar estas pruebas, se digirieron 10 μ g de DNA de pLS1 con HinFI, cuya secuencia de reconocimiento es 5'-G/ANTC-3', y los siete fragmentos resultantes (Fig. 19) fueron tratados con Pol IK, en presencia de α -[32 P]-dATP y α -[32 P]-dTTP (40 μ Ci de cada uno).

Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en un gel preparativo de PAA al 5% e identificados mediante autorradiografía del gel. El fragmento HinFI F de 213 pb fue eluido. Este fragmento tenía ambas cadenas de DNA marcadas en sus extremos 3' por incorporación de tres nucleótidos radiactivos, ya que la secuencia a ambos lados del fragmento es: 5'-G/AATC-3'. Ambas cadenas fueron separadas mediante PAGE en las condiciones descritas en el apartado 10.4 de Métodos. Por autorradiografía del gel se visualizaron tres bandas de similar intensidad. La banda que presentaba mayor movilidad migraba en la misma posición que la observada en una muestra control del mismo fragmento de DNA no sometido a denaturalización previa. Esta banda correspondía, por lo tanto, al fragmento HinFI F nativo. Las otras dos bandas ocupaban una posición cercana entre sí, por encima de la del fragmento nativo, y corresponden a cada una de las cadenas separadas de dicho fragmento. Arbitrariamente denominamos Fa a la cadena que migraba más arriba en el gel, y Fb a la complementaria. Las cadenas se eluyeron por separado, empleándose una parte para su identificación y el resto como

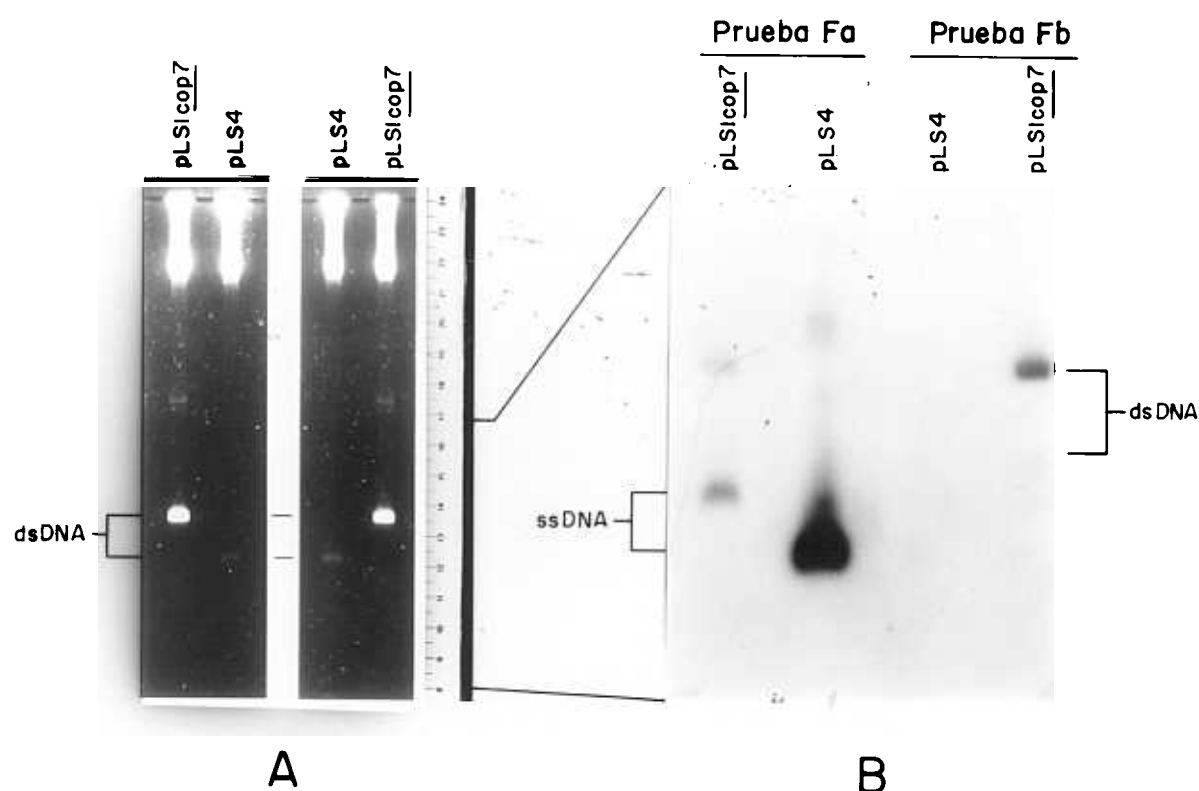


Figura 21. Especificidad de hebra del ssDNA del replicón pLS1. A, electroforesis en gel de agarosa de lisados preparados a partir de pneumococos que contienen los derivados de pLS1 que se indican; cada muestra se cargó por duplicado. B, hibridación del DNA (muestras del panel A) transferido a nitrocelulosa sin desnaturalización, con cada una de las cadenas purificadas, radiativamente marcadas, del fragmento HinFI F de pLS1 (pruebas Fa y Fb). Se indica la posición de las formas monocatenarias (ssDNA) y de las formas bicatenarias superenrolladas monoméricas (dsDNA) de uno y otro plásmido. Para la identificación de las pruebas, véase la Figura 22.

sonda radiactiva para determinar la especificidad de cadena del ssDNA. Los resultados de la hibridación con una u otra de las pruebas se muestran en la Fig. 21B. Las formas plasmídicas monocatenarias de los derivados de pLS1 hibridan sólo con la prueba Fa. La intensidad de la marca es mucho mayor para el ssDNA de pLS4 que para el de pLS1*cop7*, como corresponde a una mayor acumulación de formas monocatenarias en el primero (se verá más adelante). Por el contrario, no se observa hibridación significativa entre las formas plasmídicas de cadena sencilla y la prueba Fb, ni siquiera para pLS4. El material de migración lenta, visible para pLS1*cop7*, resultaría de la hibridación de las pruebas con una pequeña parte de dsDNA transferido al filtro, ya que ocupa la posición correspondiente a las formas monoméricas superenrolladas de este plásmido (Fig. 21B). Los resultados demuestran que sólo una de las cadenas del DNA plasmídico es convertida en ssDNA, como ocurriría durante el proceso de replicación por un mecanismo tipo círculo rodante.

Para identificar qué cadena del DNA de pLS1 corresponde a cada una de las pruebas (Fa y Fb), diseñamos un experimento de hibridación basado en la reconstrucción de fragmentos de DNA bicatenario a partir de una mezcla de las pruebas monocatenarias marcadas y de fragmentos de restricción de pLS1 desnaturalizados (Fig. 22A). Para ello, 5 μ g de DNA de pLS1 digerido con HinfI se mezclaron por separado con una u otra de las pruebas complementarias (Fa o Fb, 3×10^4 cpm de cada una). El DNA fue desnaturalizado en presencia de formamida al 80% y NaCl 0.4 M por calentamiento a 85°C durante 15 min. A continuación se permitió la hibridación por incubación a 35°C durante 16 horas en formamida al 50% y NaCl 0.9 M. Después de precipitar y lavar con etanol, el DNA anillado fue digerido con BglI, enzima que corta el fragmento HinfI F en un sitio único, dando lugar a dos fragmentos de diferente tamaño (117 y 96 pb). Los productos de la digestión se separaron por PAGE (12% PAA), y los fragmentos marcados se visualizaron mediante autorradiografía del gel (Fig. 22B). Para moléculas híbridas en las que la hebra marcada radiactivamente corresponde a la cadena codificante de pLS1, el único fragmento BglI-HinfI marcado será el de 96 pb (parte izquierda del esquema en la Fig. 22A). Por el contrario, sólo el fragmento BglI-HinfI de 117 pb estará marcado tras la digestión con BglI de moléculas híbridas en las que la cadena no codificante es la que lleva la marca (parte derecha del esquema). Esto nos permitía la identificación de la cadena presente en cada una de las pruebas. Para posicionar los dos fragmentos HinfI-BglI, se digirió con BglI una muestra (3×10^4 cpm) de DNA del fragmento HinfI F nativo marcado en los extremos 3' de ambas cadenas. Tanto el fragmento sin digerir (Fig. 22B, calle 1), como los dos fragmentos resultantes de esta digestión (calle 3) están marcados y pueden ser visualizados. En el autorradiograma se presentan también los

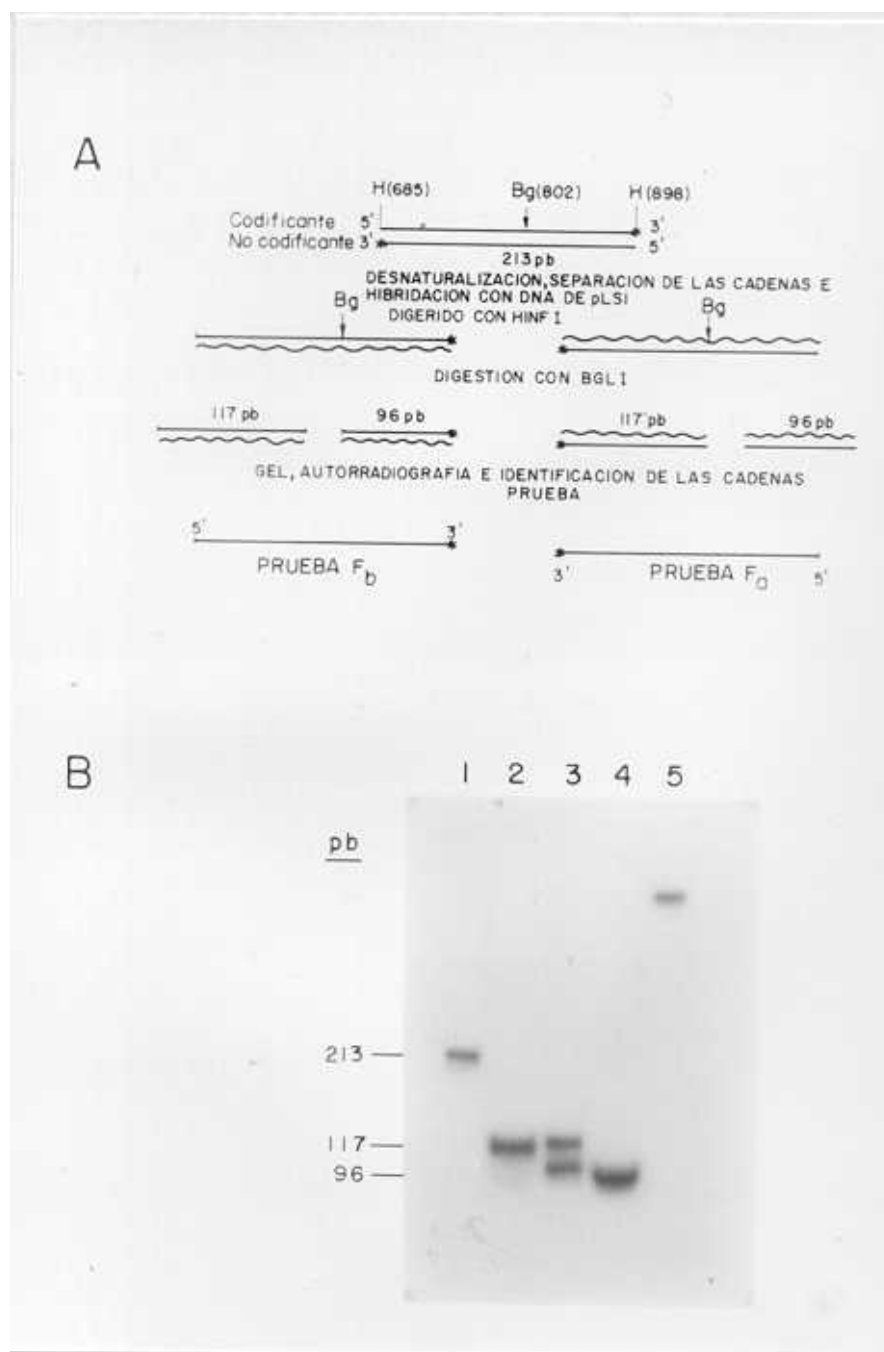


Figura 22. Identificación de las pruebas Fa y Fb empleadas en el experimento de la Figura 21. **A**, esquema de la estrategia experimental utilizada: las dos cadenas purificadas del fragmento HinfI F marcado en los extremos 3' (*) se hibridaron, por separado, con DNA total frío de pLS1, digerido con HinfI (líneas onduladas). Los productos de la hibridación se digirieron con BglI (Bg), y se sometieron a electroforesis y posterior autorradiografía. Se indica el tamaño de los fragmentos y las coordenadas de los sitios de corte por HinfI (H) y BglI (Bg). **B**, autorradiograma que muestra los resultados obtenidos. Controles: fragmento HinfI F nativo, marcado radiactivamente, no digerido (calle 1) o digerido con BglI (calle 3); y prueba monocatenaria Fb purificada (calle 5). Los resultados de los experimentos de identificación de las pruebas Fa y Fb se muestran en las calles 2 y 4: moléculas hibridadas con la cadena marcada Fa (calle 2) o con la cadena marcada Fb (calle 4) y digeridas con BglI.

resultados de los experimentos de hibridación (calles 2 y 4). La mayor parte de las moléculas de una y otra prueba han hibridado con el DNA frío, ya que no se detectan bandas en la posición correspondiente a las pruebas monocatenarias (compárese la banda observada en la calle 5, correspondiente al ssDNA de Fb con las bandas de las calles 2 y 4). En la muestra correspondiente a la hibridación con la prueba Fa sólo se detecta el fragmento de 117 pb (calle 2), mientras que cuando se emplea la prueba Fb, el fragmento de 96 pb es el único que aparece marcado (calle 4). Estos resultados demuestran que las pruebas Fa y Fb corresponden, respectivamente, a las cadenas no codificante y codificante de pLS1. La identificación de las pruebas se realizó también por secuenciación de su DNA (resultados no mostrados). El experimento diseñado para identificar las pruebas presenta una serie de ventajas sobre la secuenciación, incluyendo la sencillez y rapidez de los ensayos, así como la poca marca que se necesita para los mismos. Así, utilizando 3×10^4 cpm de cada prueba, sólo se precisaron 2 horas de exposición para obtener los resultados que se muestran en la Figura 22B. Además, los ensayos de hibridación permiten conocer y estimar la contaminación de cada una de las pruebas por la prueba complementaria. En tanto que no pudimos detectar contaminación por Fa en la preparación de Fb, una pequeña proporción de Fb (alrededor de un 5%) contaminaba la prueba Fa, según estimamos midiendo la radiactividad presente en las posiciones correspondientes a los fragmentos de 117 pb y 96 pb.

A partir de los resultados mostrados en las Figuras 21 y 22, podemos concluir que sólo la cadena codificante de pLS1 es convertida en ssDNA. Este hecho apoya de nuevo una replicación del plásmido tipo círculo rodante y permite, además, deducir la dirección que llevaría *in vivo* la replicación de la cadena líder (cadena +) si el plásmido

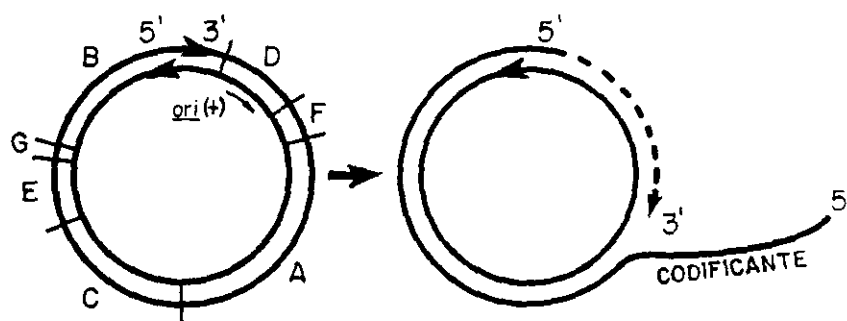


Figura 23. Dirección de la síntesis *in vivo* de la cadena líder de pLS1. Asumiendo para este plásmido una replicación tipo círculo rodante, la dirección de la cadena líder se ha deducido a partir de la especificidad de hebra del ssDNA del replicón pLS1 (Figs. 21 y 22). La cadena codificante del plásmido constituye la hebra (+) (la que se "pela" para dar lugar a las formas monocatenarias), y es la primera en sintetizarse durante la replicación (cadena líder). La dirección de replicación deducida *in vivo* (en el sentido de las agujas del reloj) coincide con la determinada *in vitro* a partir del marcaje secuencial de los fragmentos Hinfl (representados por las letras correspondientes).

replicara realmente mediante este mecanismo (según el esquema de la Fig. 23). De ocurrir así, la cadena codificante sería, al mismo tiempo, la hebra desplazada para dar lugar al ssDNA y la cadena líder. Para que la síntesis de ésta se lleve a cabo de 5'→3', la replicación debe darse en el sentido de las agujas del reloj, ya que éste es el sentido 5'→3' de la cadena codificante. De esta forma, la dirección de replicación de la cadena (+) *in vivo* coincidiría con la dirección de replicación observada en el sistema *in vitro* de *E.coli*.

Mapeo de posibles estructuras secundarias en el DNA de pLS1.

La superhelicidad del DNA molde parece ser un requerimiento de la replicación *in vitro* de los plásmidos de estreptococos: por una parte, las formas plasmídicas OC no son sustratos eficientes en este sistema; por otra, la inhibición por Nov de la DNA girasa presente en los extractos conduce a la relajación del DNA molde, al tiempo que bloquea la replicación de DNA en extractos con y sin plásmido endógeno (Fig. 17 y Tabla 5). Esto podría deberse a la implicación de estructuras secundarias en la replicación de estos plásmidos. Tales estructuras deberían localizarse en los alrededores del sitio de iniciación de la replicación (fragmento Hinfl D de pLS1; Fig. 19). Secuencias de DNA inversamente repetidas pueden generar estructuras de tipo tallo-lazo que se darían exclusivamente en DNA superenrollado, contribuyendo a liberar su tensión torsional. La endonucleasa S1, específica de cadena sencilla, puede reconocer el DNA desapareado en los lazos de estas estructuras, produciendo roturas selectivas en las formas superenrolladas del DNA, pero no en sus formas relajada o lineal (Lilley, 1980). La acción de S1 se realiza en dos etapas: en la primera, las formas ccc superenrolladas del DNA son convertidas rápidamente en formas OC por rotura de cadena sencilla en uno de los sitios sensibles a S1. En una segunda etapa, que tiene lugar lentamente, el enzima cataliza la conversión de las formas OC en formas lineales por introducción de un segundo corte opuesto al primero. Esta etapa ya no requiere superenrollamiento del DNA. Puesto que la superhelicidad se pierde al producirse el primer corte, cada molécula de DNA podrá ser cortada por S1 en uno solo de los sitios sensibles. Por lo tanto, los productos de la acción de S1 sobre DNA superenrollado serán formas lineales, que corresponderán a una mezcla de moléculas linearizadas en los distintos sitios sensibles al enzima, y una pequeña proporción de formas OC, en las que sólo tuvo lugar la primera etapa de la reacción.

Para demostrar experimentalmente la existencia de estructuras secundarias dentro, o en las proximidades, del fragmento Hinfl D, los DNAs superenrollados de pLS1

y pLS5 se trataron, por separado, con S1. A continuación, los sitios sensibles a S1 se localizaron por digestión con EcoRI o con EcoRI y HpaII, enzimas con un sitio de corte único en el DNA de pLS1 (coordenadas 3170 y 2484, respectivamente). Como se muestra en la Figura 24A, la incubación del DNA de pLS1 con S1 a 37°C, seguida de digestión con EcoRI, revela dos bandas mayoritarias complementarias de unas 3.0 kb (S1-EcoRI) y 1.4 kb (EcoRI-S1) (calle 6). Estas dos bandas no se observan, sin embargo, cuando el DNA de pLS5 es tratado de igual modo (calle 7). La doble digestión con EcoRI y HpaII del DNA de pLS1 tratado con S1 (pLS1-S1) (calle 8), muestra que el fragmento S1-EcoRI de 3.0 kb da lugar a la aparición de dos bandas de 2.3 kb (S1-HpaII) y 0.7 kb (HpaII-EcoRI), en tanto que el fragmento EcoRI-S1 de 1.4 kb no se modifica. El fragmento grande EcoRI-HpaII (3.7 kb), generado principalmente a partir de moléculas de pLS1 no linearizadas por S1, también se observa en esta calle. En el caso del DNA de pLS5-S1 sometido a la doble digestión (calle 9), las bandas mayoritarias corresponden a los dos fragmentos EcoRI-HpaII. Sin embargo, en este caso se observan varias bandas minoritarias, no detectables en pLS1 (compárense calles 6 con 7 y 8 con 9). Un experimento control realizado con DNA de pBR322 (calles 10 a 12), tratado con S1 a 37°C (calle 11) y posteriormente digerido con EcoRI (calle 12), confirma resultados previos que localizaron dos sitios sensibles a S1 en este plásmido a 3.2 y 3.05 kb del sitio EcoRI único (Lilley, 1980). A partir de los resultados presentados en la Figura 24A, se deduce que el sitio mayoritario sensible a S1 a 37°C mapea alrededor de la coordenada 170 del DNA de pLS1, en una región incluida en la delección de pLS5. En ausencia de este sitio, se incrementa la probabilidad de formación de otras estructuras, que de otra forma son muy minoritarias.

Se ha establecido que la selectividad de la acción de S1 sobre el DNA superenrollado de ColE1, pBR322 y RF de ϕ X174 se mantiene en un rango de temperaturas entre 7°C y 45°C (Lilley, 1980). Para intentar detectar en los plásmidos de estreptococos algún cambio conformacional dependiente de la temperatura, repetimos los análisis previos, pero realizando la incubación del DNA con S1 a diferentes temperaturas (Fig. 24B). A 42°C, la mayor parte del DNA sufre degradación, debido probablemente a digestión inespecífica por S1 (calles 4, 7, 10 y 13). A 37°C, los resultados son idénticos a los de ensayos previos (calles 3, 6, 9 y 12). Cuando el tratamiento con S1 se lleva a cabo a 10°C, se aprecia una notable diferencia en el patrón de bandas de pLS1 con respecto al obtenido en ensayos a 37°C, mientras que para pLS5 no se observan variaciones significativas. Así, cuando el DNA de pLS1-S1 (10°C) se digiere con EcoRI (calle 2) se observan tres bandas mayoritarias de 2.7, 3.0 y 3.4 kb, además de sus complementarias, menos visibles, de 1.7 y 1.4 kb (la de 1 kb es apenas perceptible) y de los lineales de 4.4 kb. Las bandas correspondientes a 3.0 y 2.7 kb presentan intensidades

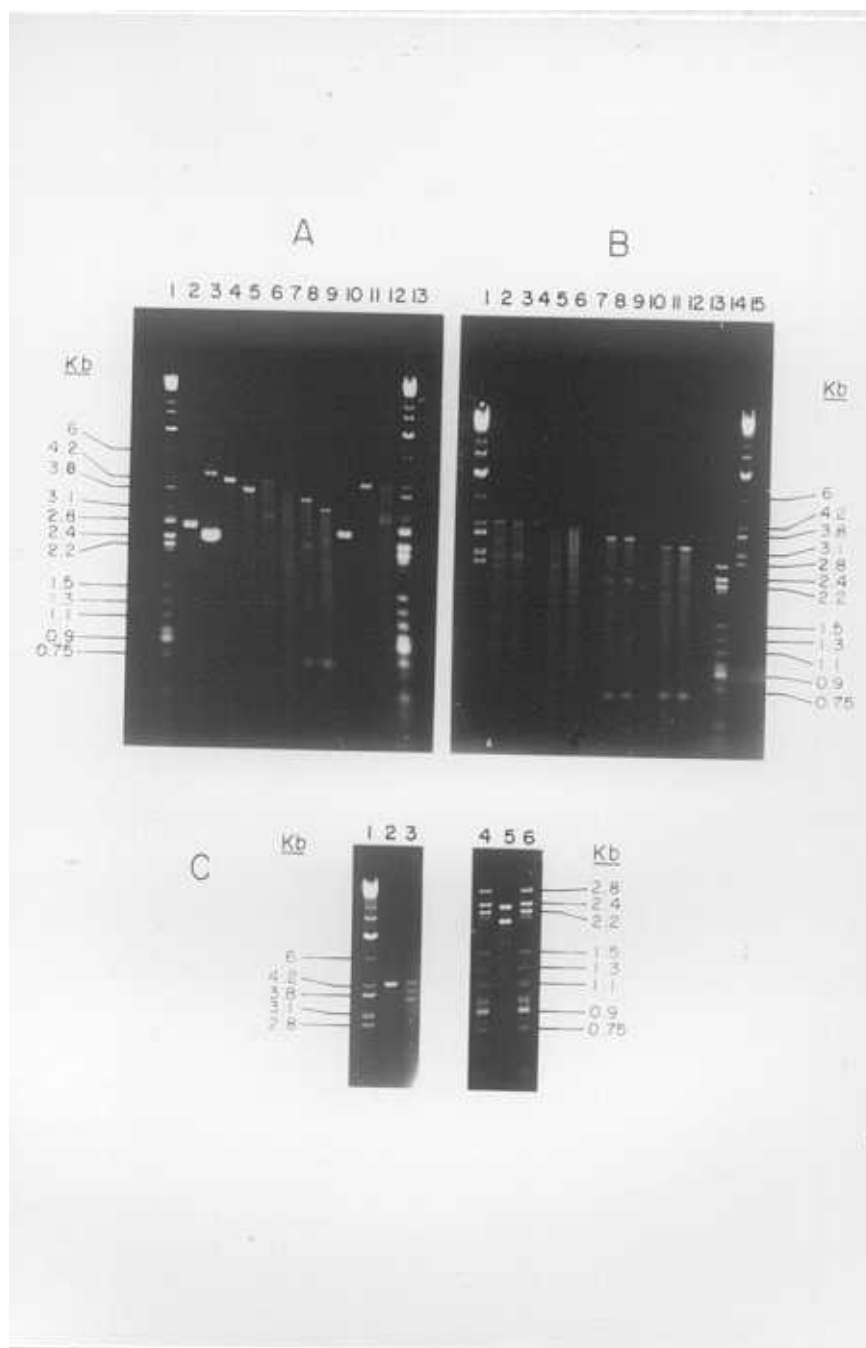


Figura 24. Localización de estructuras secundarias en el DNA de pLS1 mediante nucleasa S1. **A**, Mapeo con EcoRI y HpaII de sitios sensibles a S1 a 37°C. Se muestran los DNAs superenrollados de pLS1 (calle 2), pLS5 (calle 3) y pBR322 (calle 10), y los productos de digestión de estos DNAs por S1 a 37°C (calles 4, 5 y 11, respectivamente). El DNA de pLS1 linearizado por S1 (pLS1-S1; 37°C) fue digerido con EcoRI (calle 6) o con EcoRI+HpaII (calle 8); el mismo tratamiento se realizó con el DNA de pLS5-S1 (calles 7 y 9, respectivamente), en tanto que el DNA control de pBR322-S1 fue digerido sólo con EcoRI (calle 12). Calles 1 y 13: patrones de longitud molecular (una mezcla de los fragmentos MboI y HpaII del DNA de T7), con los tamaños relevantes indicados a la izquierda. **B**, efecto de la temperatura sobre la selectividad de corte por S1 de los DNAs de pLS1 y pLS5. El DNA de pLS1-S1 (10°C) fue digerido con EcoRI (calle 2) o con EcoRI+HpaII (calle 8); el mismo tratamiento se efectuó sobre el DNA de pLS1-S1 (37°C) (calles 3 y 9, respectivamente) o con el DNA de pLS1-S1 (42°C) (calles 4 y 10, respectivamente). Un análisis similar se llevó a cabo con el DNA de pLS5 linearizado con S1 a 10°C (calles 5 y 11), 37°C (calles 6 y 12) o 42°C (calles 7 y 13); calles 5 a 7: DNA de pLS5-S1 digerido con EcoRI; calles 11 a 13: DNA de pLS5-S1 digerido con EcoRI+HpaII. Calles 1 y 15 (DNA de T7 digerido con MboI), y calle 14 (DNA de T7 digerido con HpaII): patrones de longitud molecular, con los tamaños relevantes indicados a la derecha. **C**, Mapeo con BglI y EcoRI de sitios sensibles a S1 a 10°C. El DNA de pLS1-S1 (10°C) (calle 2) se digirió con BglI (calle 3) o con BglI+EcoRI (calle 5). Como patrones de longitud molecular se han incluido los fragmentos MboI del DNA de T7 (calle 1, con el tamaño indicado a la izquierda) y los fragmentos HpaII del mismo DNA (calles 4 y 6, con el tamaño indicado a la derecha).

similares, en tanto que la banda de 3.4 kb es más tenue. El fragmento S1-EcoRI de 3.0 kb contiene el sitio HpaII, ya que es digerido por este enzima, dando lugar a la aparición de un fragmento S1-HpaII de 2.3 kb (calle 8). Tal y como observamos en ensayos previos, el DNA de pLS1 tratado con S1 a 37°C también da lugar a los fragmentos de 3.0 kb (S1-EcoRI) y de 2.3 kb (S1-HpaII), tras la digestión con EcoRI (calle 3) y con EcoRI y HpaII (calle 9), respectivamente. Por lo tanto, el sitio sensible a S1 que da lugar a estos fragmentos corresponde al sitio mayoritario de reconocimiento a 37°C (alrededor de la coordenada 170 de pLS1). Por su parte, el fragmento S1-EcoRI de 2.7 kb permite localizar un segundo sitio sensible a S1, más frecuente a 10°C que a 37°C (calles 2 y 3, respectivamente). Un fragmento de igual tamaño aparece tras la digestión con EcoRI del DNA de pLS5 tratado con S1 a 10°C (calle 5) o a 37°C (calle 6), por lo que dicho fragmento no contendría la región delecionada en este plásmido. En dobles cortes EcoRI+HpaII, este fragmento de 2.7 kb desaparece, dando lugar a un fragmento S1-HpaII de unas 2.0 kb, tanto para pLS1 (calles 8 y 9) como para pLS5 (calles 11 y 12). No obstante, para pLS1 aún se observa una banda tenue en la posición correspondiente a 2.7 kb procedente, como veremos más adelante, de la digestión con HpaII del fragmento S1-EcoRI de 3.4 kb. Estos resultados permiten localizar un segundo sitio de acción de S1 a 2.7 kb del sitio EcoRI, alrededor de la coordenada 470 de pLS1. Por último, existe un tercer sitio menos sensible a S1 (incluso a 10°C), a una distancia de unas 3.4 kb del sitio EcoRI. El fragmento S1-EcoRI de pLS1 correspondiente a este sitio es digerido por HpaII, apareciendo una banda muy tenue de unas 2.7 kb (bastante indefinida entre el fondo). Esto localizaría el sitio sensible a S1 alrededor de la coordenada 4170 del DNA de pLS1. Para confirmar las posiciones atribuidas a los tres sitios mayoritarios de acción de S1 a 10°C, el DNA de pLS1-S1 (10°C) se digirió con BglI (enzima con un solo sitio de corte en la coordenada 804), o con BglI y EcoRI (Fig. 24C). En la digestión con BglI (calle 3) se observan, además de los lineales de 4.4 kb, fragmentos S1-BglI de unas 4 kb, 3.7 kb y 3.4 kb (la banda correspondiente a este último fragmento es menos intensa). Hacia el nucleótido 400, a 4 kb del sitio BglI, hemos localizado uno de los sitios sensibles a S1. Si el fragmento S1-BglI de 4 kb corresponde a este sitio, debe ser digerido con EcoRI para dar lugar a un fragmento S1-EcoRI de 1.7 kb. Una banda correspondiente a este tamaño se observa, efectivamente, tras la doble digestión del DNA de pLS1-S1 (10°C) (calle 5). El fragmento S1-BglI de 3.7 kb resultaría, por su parte, de la digestión con BglI de moléculas linearizadas en el sitio sensible a S1 localizado hacia el nucleótido 100 de pLS1. Este fragmento desaparece por digestión con EcoRI (calle 5), dando lugar al fragmento S1-EcoRI de 1.3 kb esperado para un sitio de acción de S1 con esa localización. Las bandas más intensas observadas en moléculas sometidas a doble restricción por BglI+EcoRI corresponden a los fragmentos EcoRI-BglI de 2.4 y 2.0 kb. Por último, un sitio sensible a S1 localizado en las proximidades de la coordenada 4170,

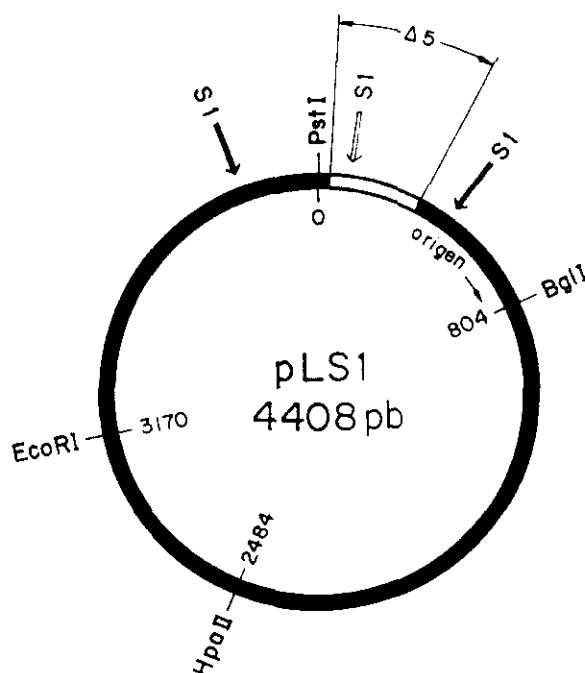


Figura 25. Localización de los sitios sensibles a S1 sobre el mapa de pLS1. Las flechas (dos llenas y una vacía) señalan los tres sitios mayoritarios de acción de S1 a 10°C. La flecha vacía indica, además, el principal sitio sensible a S1 a 37°C. Se muestran también las coordenadas de corte de los enzimas de restricción empleados en el mapeo de los sitios S1, la región delecionada en pLS5 ($\Delta 5$), y la posición aproximada del origen de replicación.

daría lugar a un fragmento S1-BglI de unas 3.4 kb, que es observado en la calle 3. Este fragmento es digerido por EcoRI (calle 5), dando lugar a un fragmento S1-EcoRI de 1 kb, que no es detectable.

En resumen, hemos localizado tres sitios mayoritarios de sensibilidad a S1 alrededor de las coordenadas 100-170, 400-470, y 4170-4200. Otros sitios minoritarios se localizaron, con menor precisión, en los alrededores de las coordenadas 2300 y 3200. En la Figura 25 se representa un mapa de los plásmidos pLS1 y pLS5 en el que se indican los sitios mayoritarios de acción de S1 a 10°C, y su localización con respecto a los sitios de corte de los enzimas de restricción usados en estos ensayos. Con estos datos, analizamos por computador (usando el programa LOOPS) la secuencia de DNA de pLS1 en las proximidades de los tres sitios mayoritarios sensibles a S1. De esta forma, localizamos cuatro repeticiones invertidas que podrían dar lugar a otras tantas estructuras secundarias de tipo tallo-lazo, que en adelante denominaremos horquillas. Alrededor de la posición 4170 existe una larga e imperfecta repetición invertida que podría formar una horquilla centrada entre los nucleótidos 4159-4160 de pLS1. Esta estructura está implicada en la iniciación de la síntesis de la cadena retrasada, y será estudiada con detalle más adelante. También existe una repetición inversa perfecta de 16 pb (separada por 6 pb no

repetidos), que se extiende desde la coordenada 83 a la 120, estando centrada entre los nucleótidos 101 y 102 de pLS1. Hemos denominado horquilla III a la estructura tallo-lazo que podría resultar de esta repetición inversa (Fig. 26). Dicha estructura estaría incluida en la región delecionada en el plásmido pLS5, y correspondería al sitio sensible a S1 posicionado alrededor de los nucleótidos 100-170 de pLS1, esto es, al sitio mayoritario a 37°C. Sin embargo, la formación de la horquilla III no es esencial para que se inicie la replicación, ya que el plásmido pLS5 replica en el sistema *in vitro* con la misma eficiencia que pLS1, en tanto que *in vivo* presenta un número de copias dos veces mayor que el de este plásmido. En la región delecionada en pLS5 existe, además, un RNA putativo (RNA I) que se transcribiría en dirección contraria a la de los mRNAs de pLS1. El promotor putativo de este RNA I presenta la secuencia consenso: 5'-TTGACA-3' y 5'-TATAAT-3' en las cajas -35 y -10, respectivamente, separadas por 18 pb. Ya que la deleción de pLS5 afecta tanto a la horquilla III como al putativo RNA I, el incremento en el número de copias de éste y de otros plásmidos delecionados en esta región podría deberse a la carencia de uno u otro de estos elementos. Por otra parte, dentro ya del fragmento Hinfl D, existe una región comprendida entre las coordenadas 405 y 460 de la secuencia de pLS1 que presenta dos repeticiones invertidas de 9 y 11 pb, respectivamente, con capacidad para formar las horquillas I y II representadas en la Figura 26. Estas estructuras podrían constituir, por lo tanto, el sitio sensible a S1 que habíamos localizado hacia la posición 400-470 del DNA de pLS1. Aunque, debido a su proximidad, no podemos distinguir cuál de los lazos de cadena sencilla es reconocido por S1, la estabilidad predicha para la horquilla I es bastante más alta, no sólo por la mayor

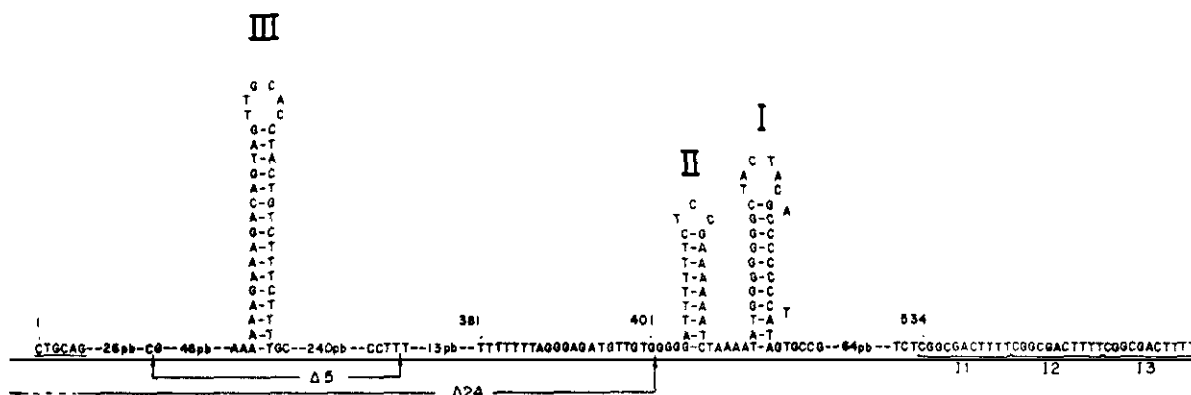


Figura 26. Posibles estructuras tallo-lazo en las inmediaciones del sitio de iniciación de la replicación de pLS1. Se ha representado la cadena (+) de pLS1, indicándose la región delecionada en pLS5 ($\Delta 5$) y el extremo derecho de la deleción en pLS1 $\Delta 24$ ($\Delta 24$). La formación de las horquillas I-III ha sido propuesta en base a las características de la secuencia de DNA y a la localización de sitios sensibles a S1 sobre la forma plasmídica superenrollada. La horquilla II podría no formarse. Próximos a la horquilla I se encuentran los tres iterones (I1 a I3) del plásmido.

longitud de su tallo, sino también por los 8 pares G-C presentes en él. Debido a su localización dentro del fragmento HinfI D (en el cual se inicia la replicación) estas estructuras eran los mejores candidatos para ser considerados como elementos requeridos para un origen funcional, explicando así la necesidad de superenrollamiento del DNA que va a ser replicado.

Análisis de delección del origen funcional.

A lo largo de este trabajo, distinguiremos entre el sitio de iniciación de la replicación (la localización del primer nucleótido incorporado) y el origen funcional (el menor segmento requerido en *cis* para que haya actividad biológica). En tanto que el primero ha sido localizado mediante el sistema *in vitro* en el fragmento HinfI D de pLS1, la determinación del segundo se ha realizado por análisis de la secuencia de DNA de derivados delecionados capaces de replicar en pneumococos.

El plásmido pLS5 tiene una delección bien caracterizada (coordenadas 34 a 365 de pLS1, ambas incluidas), que comprende 123 pb del fragmento HinfI D. Para construir derivados cuyas deleciones se adentraran más en este fragmento, el DNA de pLS1 se linearizó con BanI (enzima con un sitio de corte único en la coordenada 214), y se digirió con nucleasa BAL31 de forma que se generaran deleciones de 500 a 1000 pb. La mezcla de ligación se usó para transformar *S.pneumoniae* 708, realizándose a continuación un análisis de restricción de 60 de los transformantes Tc'. Todas las deleciones grandes (superiores a unos 400 pb) eran asimétricas, de forma que se extendían principalmente hacia la izquierda del sitio BanI (según se representa, de 5' a 3', la secuencia de la cadena codificante). Además, encontramos una serie de derivados que habían perdido tanto la horquilla III centrada en la posición 101-102 (Fig. 26), como el putativo RNA I. Estos derivados presentaban un número de copias doble que el del plásmido parental, siempre que la delección no se extendiera mucho más allá del sitio de corte NcoI en la posición 4221. Si esto sucedía, el número de copias descendía nuevamente, debido a la desaparición de la señal de iniciación de la cadena retrasada, de la que trataremos más adelante. Entre los derivados que conservan el sitio NcoI en 4221, seleccionamos el más pequeño (denominado pLS1Δ24) para determinar su secuencia de nucleótidos en los extremos de la delección. De esta forma hemos determinado que la región delecionada en este plásmido se extiende 382 pb a la izquierda del sitio BanI y sólo 187 pb a su derecha, es decir desde el nucleótido 4240 al 401, ambos incluidos. Este plásmido replica normalmente *in vivo*, y presenta el fenotipo de doble número de copias característico de los plásmidos que

carecen de la horquilla III y/o del RNA I. La delección de pLS1 Δ 24 llega casi hasta la base de la horquilla II (Fig. 26), siendo, hasta el momento, la delección que más se adentra por el extremo izquierdo del fragmento HinfI D. En otra serie de experimentos que detallaremos más adelante, el DNA de pLS1 fue linearizado en el sitio BglII (coordinada 804) y digerido con BAL31, de forma que se obtuvieron derivados delecionados que se adentran por el extremo derecho en el fragmento HinfI D. La delección que más se extiende en este sentido es la del plásmido pLS1 Δ A4, que incluye las coordenadas 649 a 816.

Las delecciones de pLS1 Δ 24 y pLS1 Δ A4, junto con las de otros derivados obtenidos en este trabajo, nos han permitido delimitar el origen funcional de pLS1. En la Figura 27 se muestran las regiones del replicón de pLS1 delecionadas en los distintos derivados. Todos estos plásmidos pueden ser establecidos y mantenidos en células de pneumococos, por lo que deben poseer todos los elementos necesarios en *cis* para su replicación. Sin embargo, el plásmido pLS1 Δ A15 (cuya delección incluye los nucleótidos 760 a 854) carece de una función requerida para su replicación, que puede ser complementada en *trans* (la proteína RepB, iniciadora de este proceso). Por lo tanto, pLS1 Δ A15 sólo puede establecerse en presencia de otro plásmido que le suministre dicha

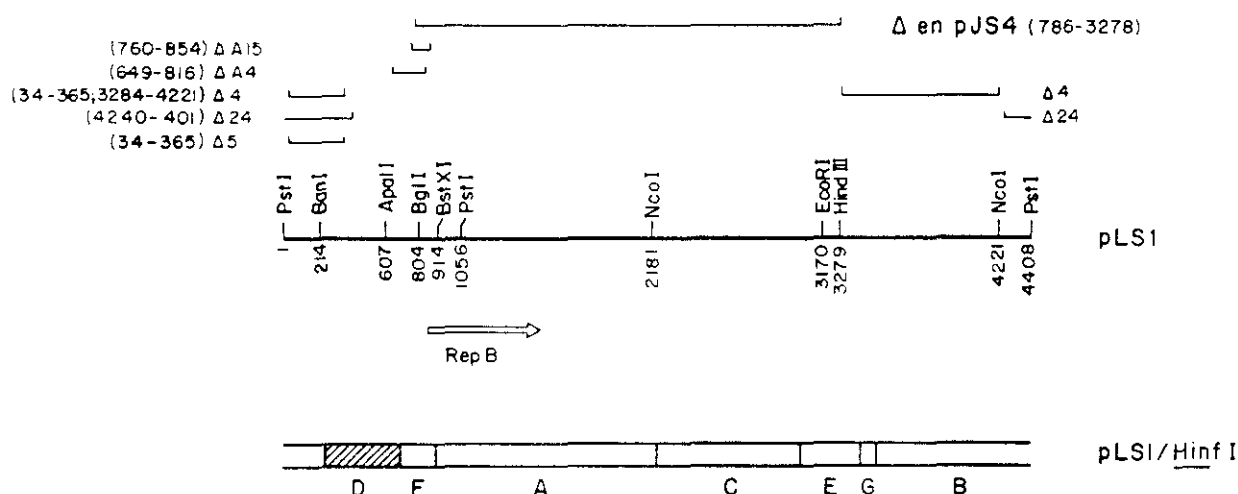


Figura 27. Análisis de delección del origen funcional de replicación de pLS1. Las líneas por encima del mapa de restricción de pLS1 representan las regiones delecionadas en los distintos derivados analizados. Para los plásmidos cuya secuencia de DNA procede exclusivamente de pLS1, los nombres de las delecciones y los nucleótidos incluidos en ellas se presentan a la izquierda. Δ A15: delección en pLS1 Δ A15; Δ A4: delección en pLS1 Δ A4; Δ 4: delección en pLS4; Δ 24: delección en pLS1 Δ 24; Δ 5: delección en pLS5. Para pJS4, cuya secuencia de DNA procede en parte de pLS1 y en parte de pC194, se representa sólo la delección que afecta al DNA de pLS1 (coordenadas entre paréntesis). En la parte inferior de la figura se muestra el mapa correspondiente a los fragmentos HinfI de pLS1; el fragmento D (en el que hemos localizado el sitio de iniciación de la replicación) aparece rayado. Entre los dos mapas físicos se indica la posición del gen para una función (RepB) esencial para la replicación del plásmido.

función. Esta complementación de RepB en *trans* se observa también para el plásmido pJS4, un derivado Cm^r aislado *in vivo* y basado en el replicón pLS1. Este plásmido contiene la secuencia de pLS1 entre las coordenadas 3279 y 785, junto con el gen *cat* de pC194 (Ballester y cols, 1989). La región de pLS1 delecionada en pJS4 se muestra en la Figura 27. A partir de los resultados mostrados en esta Figura, podemos establecer que el origen funcional de pLS1 está incluido en una región de 247 pb que se extiende desde el extremo derecho de la deleción de pLS1 Δ 24 (nucleótido 402) al extremo izquierdo de la deleción de pLS1 Δ A4 (nucleótido 648). Sin embargo, no hemos conseguido replicación a partir del *ori*(+) de pLS1 cuando la mínima región que supuestamente lo contiene es clonada en otros replicones y la proteína iniciadora RepB es suministrada en *trans*. Entre otras estrategias, tratamos de clonar el fragmento BanI(214)-ApaLI(607) de pLS1 en el sitio HindIII único de un plásmido pC194*cop* cuyas funciones de replicación han sido inactivadas. Intentos para establecer esta construcción en pneumococos que llevan pLS1*cop*7 (para suministrar RepB en *trans*) fueron infructuosos (no se muestra). Es posible que la elección tanto del DNA vector como de la región de éste en que se va a clonar el *ori*(+) tenga una gran importancia a la hora de conseguir una actividad funcional de dicho origen (véase Discusión).

La región en la que hemos delimitado el origen funcional de pLS1 está totalmente incluida en el fragmento Hinfl D y presenta, además de las horquillas I y II, tres repeticiones directas adyacentes de 11 pb (iterones I1 a I3) que se inician a 74 pb del final de la horquilla I (Fig. 28). Hasta el momento en que se realizó esta parte del trabajo, no se habían encontrado elementos estructurales similares en otros plásmidos pequeños de bacterias gram-positivas, aunque se habían descrito repeticiones directas en replicones de bacterias gram-negativas como F, RK2, RSF1010 y R6K. Estas secuencias parecen funcionar como sitios de unión de las proteínas de replicación en la activación de los orígenes (Filutowicz y cols, 1985; Haring y cols, 1985; Stalker y cols, 1981). La búsqueda de homologías con ordenador no ha revelado la existencia de similitudes significativas entre las repeticiones directas de pLS1 y las de estos plásmidos. Nosotros propusimos que los tres iterones de pLS1 podrían desempeñar un papel importante en el reconocimiento del origen por una o varias proteínas que, según los resultados obtenidos en el sistema de replicación *in vitro*, estarían especificadas por el plásmido y se requerirían para el proceso replicativo. Estas predicciones han sido ya confirmadas al comprobar que RepB se une a las repeticiones directas, produciendo una rotura específica de cadena al final del lazo de la horquilla I, entre los nucleótidos 448 y 449 (G/A) (de la Campa y cols, 1990; Fig. 28).

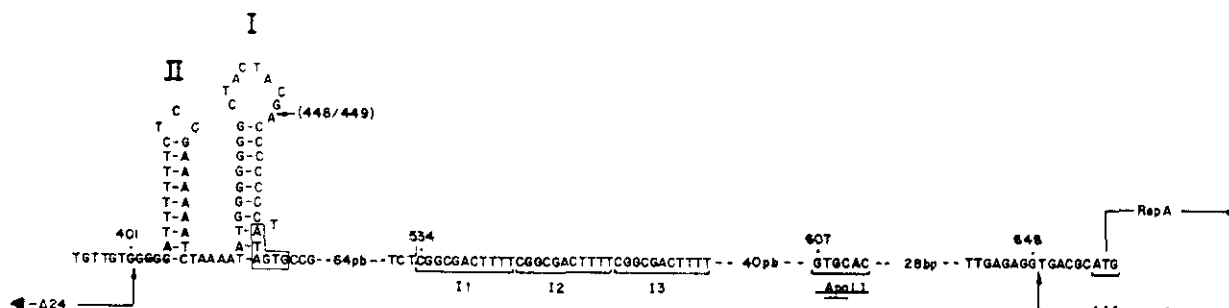


Figura 28. Elementos de secuencia en la región donde se localiza el origen funcional de pLS1. Sobre la cadena (+) del plásmido se indican los bordes de las delecciones que delimitan el origen funcional. Δ24: delección en pLS1Δ24; ΔA4: delección en pLS1ΔA4. La región delimitada incluye las horquillas I y II y los tres iterones (I1 a I3). En la base de la horquilla I se muestra, dentro de una caja, la secuencia consenso de orígenes y promotores de los DNAs fágicos (Kornberg, 1980), en tanto que en el lazo de la estructura se indica el sitio donde RepB introduce el corte monocatenario específico (de la Campa y cols, 1990). Dentro ya de la región incluida en la delección ΔA4 se localiza el inicio de la secuencia codificante de *repA*.

El contenido en G+C de la región del origen es relativamente alto (aproximadamente un 50%), comparado con el contenido total en el DNA de pLS1 (37%). Una búsqueda de homologías entre esta región de pLS1 y el origen de la cadena (+) de varios colifagos de cadena sencilla no revela similitudes significativas. Sin embargo, a nivel estructural, las horquillas I y II de pLS1 recuerdan la estructura propuesta para el origen del fago f1 (Horiuchi, 1986). Además, la secuencia consenso de orígenes y promotores de DNAs fágicos (Kornberg, 1980):

5'-CACTAT-3'
3'-GTGATA-5'

está presente en el extremo derecho de la horquilla I (Fig. 28). Por otra parte, no se han encontrado cajas para DnaA ni homología con *oriC* en esta región de pLS1. Recientemente hemos encontrado, por análisis de ordenador, homologías entre esta región de pLS1 y regiones de otros plásmidos de bacterias gram-positivas (véase Discusión).

4. EL ORIGEN DE LA CADENA RETRASADA.

Características generales del *ori*(-) de pLS1.

Como ya hemos comentado, las células de *S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli* que contienen pLS1 acumulan una determinada cantidad de formas plasmídicas monocatenarias, que parecen ser intermediarios en un mecanismo de replicación tipo círculo rodante. Para completar el proceso replicativo, estas formas de ssDNA deben ser convertidas en dsDNA. Esta etapa requeriría la existencia de una señal que actúe como origen de la cadena complementaria, tal como ocurre en los colifagos de cadena sencilla durante el paso de SS \rightarrow RF. La acumulación de ssDNA de pLS1 es mucho menor en pneumococos que en los otros dos huéspedes (Fig. 20), indicando que, si bien la replicación de este plásmido se llevaría a cabo por el mismo mecanismo en las tres especies, la conversión de ssDNA a dsDNA sería mucho más eficiente en *S.pneumoniae* que en *B.subtilis* o en *E.coli*. Por su parte, pC194 (que parece replicar también vía círculo rodante; te Riele y cols, 1986a, 1986b) acumula una gran cantidad de ssDNA en los dos huéspedes gram-positivos (nosotros no hemos conseguido establecer pC194 en *E.coli*), según se observa en la Figura 29. Estos hechos demuestran que la eficiencia de conversión de ssDNA a dsDNA depende del huésped y del replicón.

El plásmido pJS37 es un híbrido compuesto por pLS1 y pC194 unidos en sus sitios HindIII únicos de forma que las cadenas (+) de ambos replicones (las que dan lugar a formas de ssDNA) se encuentran enfrentadas en esta construcción. En *S.pneumoniae*, este plásmido replica (al menos mayoritariamente) a partir de pC194, a pesar de que los dos replicones están intactos. A partir de pJS37, se construyó un derivado (denominado pJS38) en el que se inactivó la replicación conducida por pC194 mediante el relleno con Pol IK del sitio AccI único, localizado en el gen *repH* (Ballester y cols, 1986, 1989). Por lo tanto, pJS37 y pJS38 se diferencian sólo en dos nucleótidos, pero utilizan para su replicación orígenes distintos, de manera que las formas intermediarias de ssDNA en uno y otro plásmido deben ser complementarias. Ambos plásmidos tienen un número de copias similar. Una forma de estimar la proporción de ssDNA plasmídico consiste en analizar (mediante hibridación con una sonda marcada) el DNA total transferido a membrana tras su desnaturalización. Cuando se analiza la presencia de material plasmídico monocatenario en células de pneumococos que contienen pJS37 o pJS38 (Fig. 29) se observa una mayor acumulación para pJS37, de forma que la relación ssDNA a dsDNA para este híbrido es similar a la encontrada para pC194 (Fig. 29A), cuyas

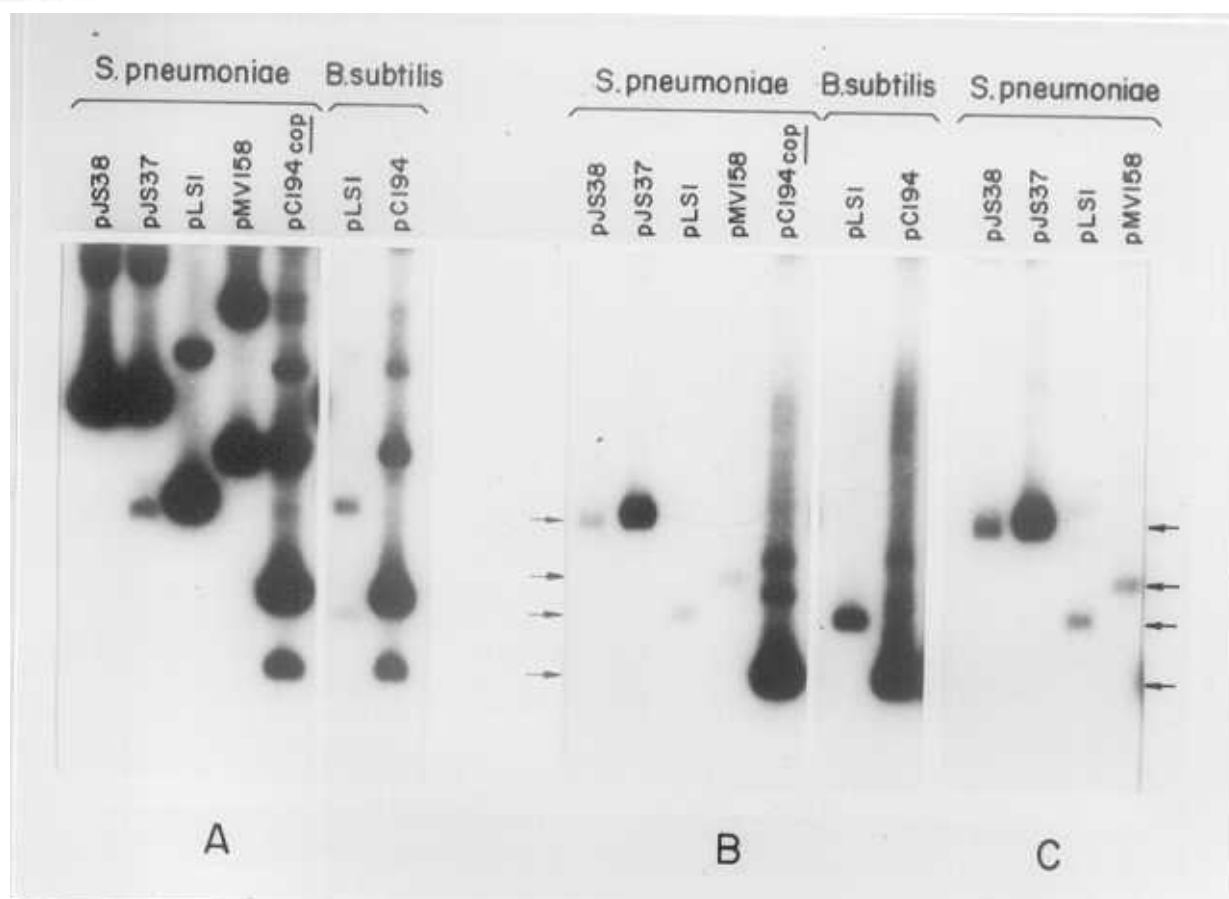


Figura 29. DNA monocatenario acumulado por distintos plásmidos en *S.pneumoniae* y *B.subtilis*. Extractos totales de células de pneumococos o *B.subtilis* que contienen los plásmidos indicados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa. El DNA de geles duplicados se transfirió a nitrocelulosa con (A) o sin (B y C) desnaturalización previa. Las formas plasmídicas transferidas se detectaron por hibridación con DNA de pJS37 radiactivamente marcado. La exposición autorradiográfica en A fue de 1 h, en B de 6 h y en C de 13 h. Las flechas en B y C señalan la posición del ssDNA de los distintos plásmidos. En A, las formas monocatenarias ocupan exactamente la misma posición, aunque no han sido señaladas para evitar confusiones con las formas de dsDNA, que también son visibles en este caso.

funciones de replicación estaría empleando. La cantidad de ssDNA de pC194 es, sin embargo, mayor que la correspondiente a pJS37. Esto se debe a que el pC194 empleado en estos experimentos tiene una mutación que le confiere en *S.pneumoniae*, pero no en *B.subtilis*, un número de copias unas 10 veces mayor que el del plásmido silvestre, que fue, a su vez, utilizado para la construcción de pJS37 (Ballester y cols, 1989). Las formas monocatenarias de pJS38, al igual que ocurre con las de pLS1 y pMV158, sólo pueden observarse, en pneumococos, tras un tiempo de exposición más largo (Fig. 29B y, especialmente, 29C), siendo similar para los tres plásmidos la relación entre ssDNA y dsDNA. La diferente eficiencia de conversión de ssDNA a dsDNA mostrada por pJS37 y pJS38 en *S.pneumoniae* sugiere la existencia de asimetría en la señal de conversión, de forma que su funcionalidad depende de la orientación. Así, dicha señal, que denominaremos *ori*(-), está presente en ambos plásmidos, pero sólo la secuencia presente en el DNA monocatenario de pJS38 (y no la complementaria) funcionará eficientemente.

En la Figura 29 se observa que, en *S.pneumoniae*, pLS1 y su parental pMV158 (los cuales presentan un número de copias aproximadamente igual en este huésped) acumulan también una cantidad similar de ssDNA. Por lo tanto, el fragmento EcoRI delecionado en pLS1 no parece contener ninguna señal que funcione como *ori*(-) para pneumococos.

Otra observación interesante en experimentos de este tipo es que la proporción de DNA plasmídico en forma monocatenaria es la misma para pLS1 y para los mutantes de copia pLS5 y pLS1*cop7*, tal como se esperaría para derivados que no tengan alterado el *ori*(-) (Fig. 30). Así, mientras que todavía no conocemos la razón del fenotipo de alto número de copias de pLS5, la mutación *cop7* afectaría a los niveles de síntesis de la proteína RepB, iniciadora de la replicación.

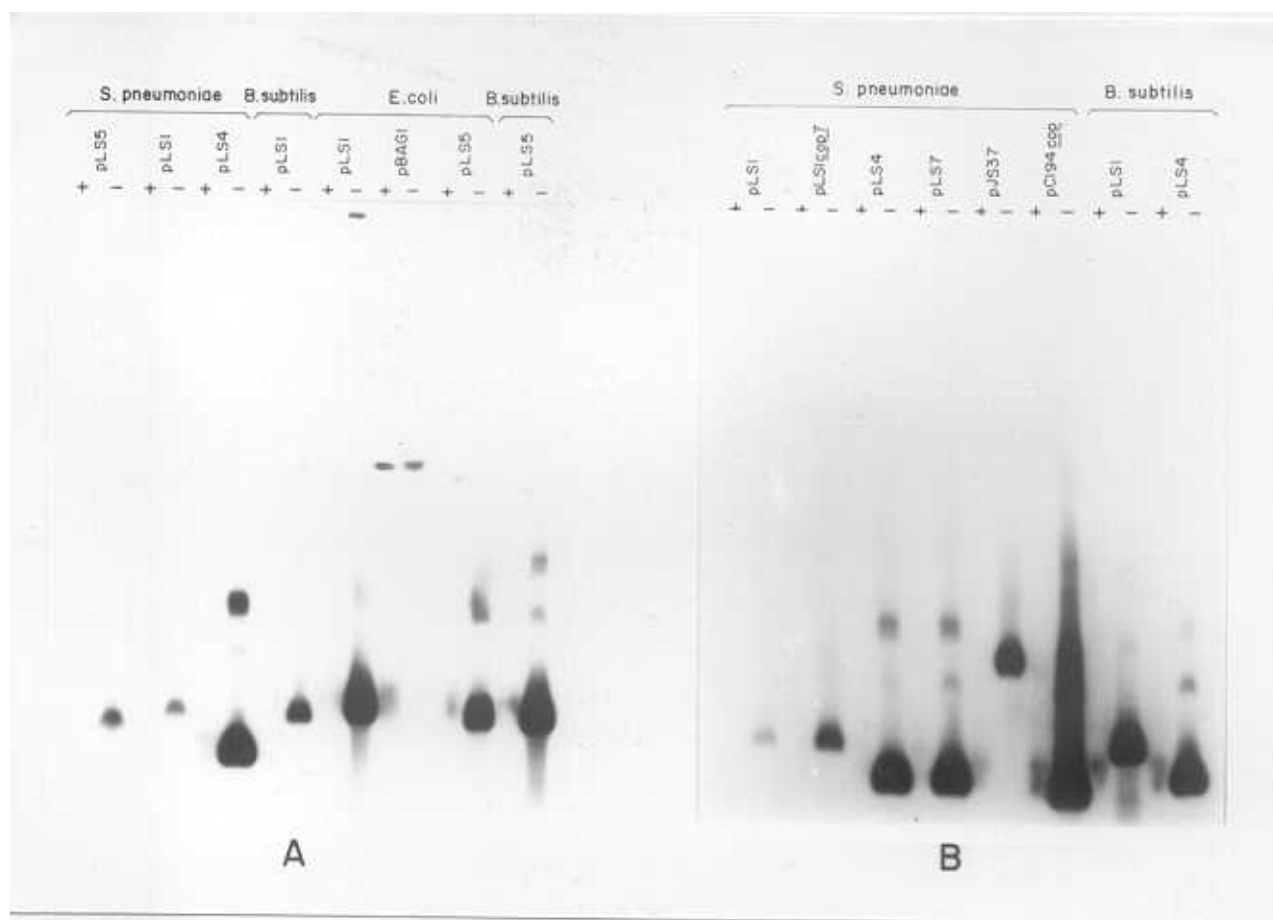


Figura 30. DNA monocatenario generado por pLS1 y sus derivados en *S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli*. Lisados preparados a partir de células que contienen los plásmidos indicados se trataron (+) o no (-) con S1 antes de la electroforesis, transferencia (sin desnaturalización) del DNA a nitrocelulosa e hibridación con una sonda radiactiva. En A se ha incluido, como control, un derivado de pBR322 (pBAG1) que no acumula ssDNA en células de *E.coli*. En B se ha incluido (también como control) pC194*cop*, que acumula una gran cantidad de monocadena en pneumococos. El autorradiograma en B ha sido sobreexpuesto para revelar la débil banda correspondiente al ssDNA de pLS1 en pneumococos.

Localización del *ori*(-) de pLS1.

En un capítulo anterior hemos comentado que el plásmido pLS4 (basado en el replicón pLS1) acumula una gran cantidad de formas monocatenarias en *S.pneumoniae* (Fig. 21B). Este plásmido fue construido a partir de pLS5 por eliminación del fragmento HindIII(3279)-NcoI(4221), en un intento de suprimir regiones de DNA no esenciales (Fig. 27). Cuando el nuevo derivado delecionado se estableció en pneumococos, se hizo evidente que presentaba, con respecto a su parental pLS5, una acusada disminución en el número de copias de dsDNA (de 52 para pLS5 a 10 para pLS4; Tabla 6; véase también Fig. 21A). Parecía, pues, que alguna función de replicación había resultado dañada como consecuencia de la deleción. Ya que la eliminación del fragmento HindIII-NcoI acerca el gen *tet* a la región donde se localiza el origen de replicación (véase Fig. 35), la disminución en el número de copias podía deberse a una interferencia de la transcripción de dicho gen con la replicación del plásmido. Para comprobar o descartar esta hipótesis, insertamos un terminador bidireccional de la transcripción, procedente del bacteriófago $\phi 29$, en el sitio EcoRI único de pLS4. El nuevo plásmido, pLS4-t, presenta un número de copias similar al de pLS4, demostrando que no existe este tipo de interferencia transcripcional (no se muestra). Otra posibilidad era que la alteración de la replicación ocurriera a nivel de la síntesis de la cadena retrasada. De ser así, la relación ssDNA a dsDNA en células de pneumococos conteniendo pLS4 debía estar aumentada con respecto a la observada en células que llevan otros plásmidos derivados de pLS1. Esto es lo que ocurre en realidad, ya que hemos encontrado que para pLS4 se acumula una mayor cantidad de formas monocatenarias que para su parental pLS5 (Fig. 30A), lo que unido a su menor número de copias (unas 5 veces más bajo) determina que pLS4 presente una proporción muy aumentada de DNA monocatenario. Estos resultados sugieren que en el fragmento HindIII(3279)-NcoI(4221) de pLS1 existe una señal que funciona eficientemente en *S.pneumoniae* como *ori*(-) del plásmido, cuya eliminación conduce a un aumento de las formas de ssDNA y a una disminución en el número de copias (dsDNA) plasmídico.

Características diferenciales de pLS4.

Dadas las peculiares características que pLS4 exhibía en pneumococos (bajo número de copias y gran acúmulo de ssDNA), era interesante conocer si este fenotipo se presentaba también en *B.subtilis* y en *E.coli*. Al mismo tiempo quisimos determinar si

TABLA 6: Características diferenciales de pLS4 en cuanto a eficiencias de transformación y número de copias en los tres huéspedes

Huésped	Eficiencias de transferencia				Número de copias		
	DNA ($\mu\text{g/ml}$)	u.f.c. / ml			pLS1	pLS5	pLS4
		pLS1	pLS5	pLS4			
<i>S.pneumoniae</i> 708	0.1	16000	21000	4000	22 \pm 2	52 \pm 6	10 \pm 2
	1.0	40000	53000	9000			
<i>B.subtilis</i> MB11 ^a	0.1	40	3800	500	4.5 \pm 0.7	9.5 \pm 1	5 \pm 1
	1.0	330	30500	4500			
<i>E.coli</i> C600	0.1	2000	3000	0 ^b	3.7 \pm 0.5	6.4 \pm 1.4	--
	1.0	10000	12000	0			

(a) Los DNAs plasmídicos se purificaron de *S.pneumoniae*; el origen heteroespecífico de los DNAs da lugar a una disminución en la eficiencia de transferencia plasmídica en *B.subtilis* (Espinosa y cols, 1982)

(b) Tampoco se obtuvieron transformantes con el DNA del plásmido pLS7 ($\Delta\text{ori}(-)$, cop7).

la delección en pLS4 afectaba de alguna manera a su capacidad para establecerse en los distintos huéspedes. Para ello, los DNAs de pLS5, pLS4 y pLS1 se purificaron a partir de cultivos de pneumococos y se usaron, a las concentraciones de 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$, para transformar cultivos competentes de las tres especies. Las eficiencias de transformación obtenidas, así como los números de copia de cada plásmido en los distintos huéspedes, se muestran en la Tabla 6. El plásmido pLS4 se transfiere, en todos los casos, con menor eficiencia que su parental pLS5. De hecho, no hemos conseguido establecerlo en *E.coli*, y para las otras dos especies se observa una disminución de unas 5 veces en el número de transformantes/ml. Sin embargo, comparado con pLS1, pLS4 se transfiere más eficientemente a *B.subtilis*. Esta mayor eficiencia no parece deberse a la presencia de más multímeros en la preparación de pLS4 que en la de pLS1, ya que hemos obtenido los mismos resultados empleando distintas preparaciones de DNA, y en ninguna de ellas hemos observado diferencias entre la proporción de multímeros de pLS1 y pLS4 por tinción del DNA con EtBr. Esta diferencia tampoco se observa cuando se analiza, por hibridación con una sonda radiactiva, el DNA total presente en extractos crudos de células de *S.pneumoniae* que contienen uno u otro plásmido. En algunas muestras de estos

experimentos, el DNA cromosómico se digirió, después de la preparación de los extractos, con una mezcla de enzimas de restricción (BamHI, BglII, PvuI y SalI) que no tienen sitios de corte en el DNA de pLS1. De esta manera, se podrían visualizar posibles formas plasmídicas multiméricas que migraran a la altura del DNA cromosómico no digerido y se evitaría también una posible interferencia de éste en la transferencia de los multímeros al filtro de nitrocelulosa, una vez desnaturalizado el DNA. El gel teñido con EtBr y el autorradiograma del filtro, correspondientes a estos experimentos, se muestran en la Figura 31. De nuevo, lo más notorio es la gran proporción de formas monocatenarias de pLS4 en comparación con pLS1. No se aprecian diferencias entre ambos plásmidos en cuanto a proporción de multímeros, ni siquiera en las muestras en las que el DNA cromosómico ha sido digerido (calles 1 y 2). Por lo tanto, la mayor eficiencia de transferencia a *B.subtilis* mostrada por pLS4 y pLS5 respecto a pLS1 podría estar relacionada con la delección que comparten los dos primeros plásmidos (coordenadas 34

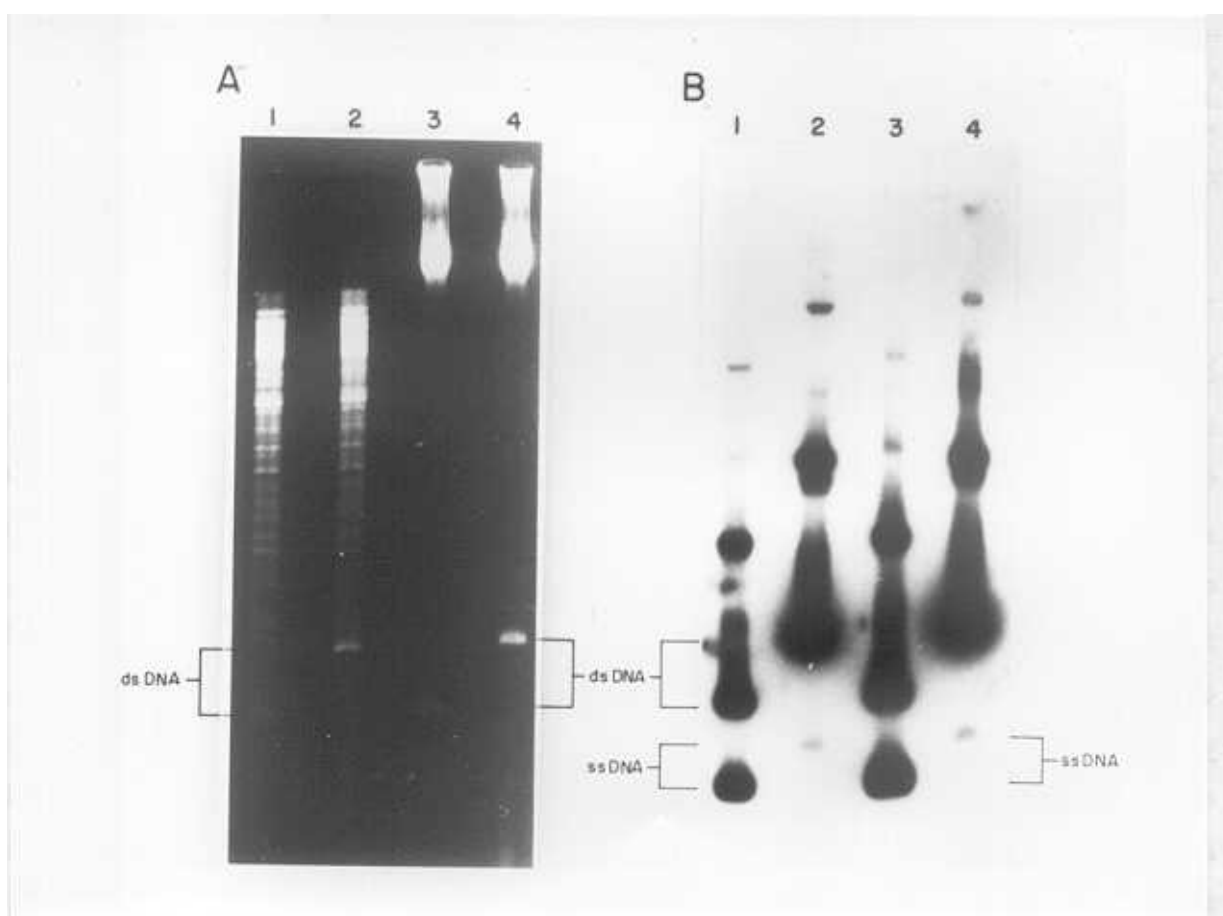


Figura 31. Proporción de las distintas formas plasmídicas de pLS1 y pLS4 en *S.pneumoniae*. Extractos totales de células que contienen pLS1 (calles 2 y 4) o pLS4 (calles 1 y 3) fueron incubados (calles 1 y 2) o no (calles 3 y 4) con una mezcla de enzimas de restricción (BamHI, BglII, PvuI y SalI) que no tienen sitios de corte en el DNA de pLS1, y sometidos a electroforesis en gel de agarosa. El DNA plasmídico fue analizado tanto por tinción con EtBr (A) como por hibridación Southern (B). Para visualizar todas las formas presentes, el DNA fue desnaturalizado antes de ser transferido a nitrocelulosa. Como dsDNA, se indican sólo las formas bicatenarias correspondientes al DNA plasmídico monomérico superenrollado.

a 365 de pLS1, ambas incluidas), en tanto que la delección específica de pLS4 le restaría eficacia para transferirse a cualquiera de las tres especies.

El número de copias plasmídico se determinó en cultivos de *S.pneumoniae* y *B.subtilis* crecidos en presencia de Tc, tanto por densitometría como por marcaje de DNA *in vivo*, obteniéndose de ambas formas valores similares (Tabla 6). Para estas determinaciones sólo se tuvieron en cuenta las formas de dsDNA. En pneumococos, la delección del fragmento HindIII(3279)-NcoI(4221) conduce a una disminución de unas 5 veces en el número de copias. Sin embargo, en *B.subtilis*, pLS1 y pLS4 presentan números de copias aproximadamente iguales, con lo que sólo hay una reducción de dos veces en el número de copias de pLS4 respecto a su parental pLS5. Esto hacía interesante la determinación de la cantidad de monocadena acumulada en células de *B.subtilis* que contienen cada uno de estos plásmidos. Tal y como ocurre en pneumococos, pLS5 acumula en *B.subtilis* mayor cantidad de ssDNA que pLS1, aunque la relación ssDNA a dsDNA se mantiene para ambos plásmidos (Fig. 30A). Comparado con pLS1, pLS4 presenta, para una cantidad similar de dsDNA, una acumulación prácticamente igual de formas monocatenarias (Fig. 30B). Estos resultados sugieren que la señal delecionada en pLS4, y que tan eficientemente actúa en *S.pneumoniae* como *ori*(-), es muy poco o en absoluto funcional en *B.subtilis*, y que un posible mecanismo alternativo para la conversión de ssDNA a dsDNA es, de cualquier forma, muy poco eficiente en este huésped.

Ya que la estabilidad de un plásmido puede estar relacionada con su número de copias, quisimos saber si pLS4 se perdía de la población durante el crecimiento exponencial de cultivos de pneumococos en ausencia de presión selectiva. En la Figura 32A se muestran los resultados de los tests de estabilidad para distintos plásmidos establecidos en *S.pneumoniae*. Mientras que no se detecta pérdida significativa de pLS1 o pLS5 durante las 60 generaciones del ensayo, pLS4 y su derivado pLS4-t muestran una similar y gran inestabilidad. La tasa experimental de pérdida (L_{ex}) para estos dos plásmidos, calculada a partir de la curva mostrada en la Figura 32A, es de 0.1 por célula y por generación (aplicando la ecuación dada en el apartado 5 de Métodos). Estos resultados no dejan de ser sorprendentes, ya que la tasa teórica de pérdida (L_t) por distribución al azar de las copias plasmídicas entre las células hijas es 10^{-6} para un plásmido que, como pLS4 en pneumococos, presente 10 copias por equivalente genómico. Este valor de L_t se desprende de la ecuación binomial:

$$L_t = (1/2)^{2n}$$

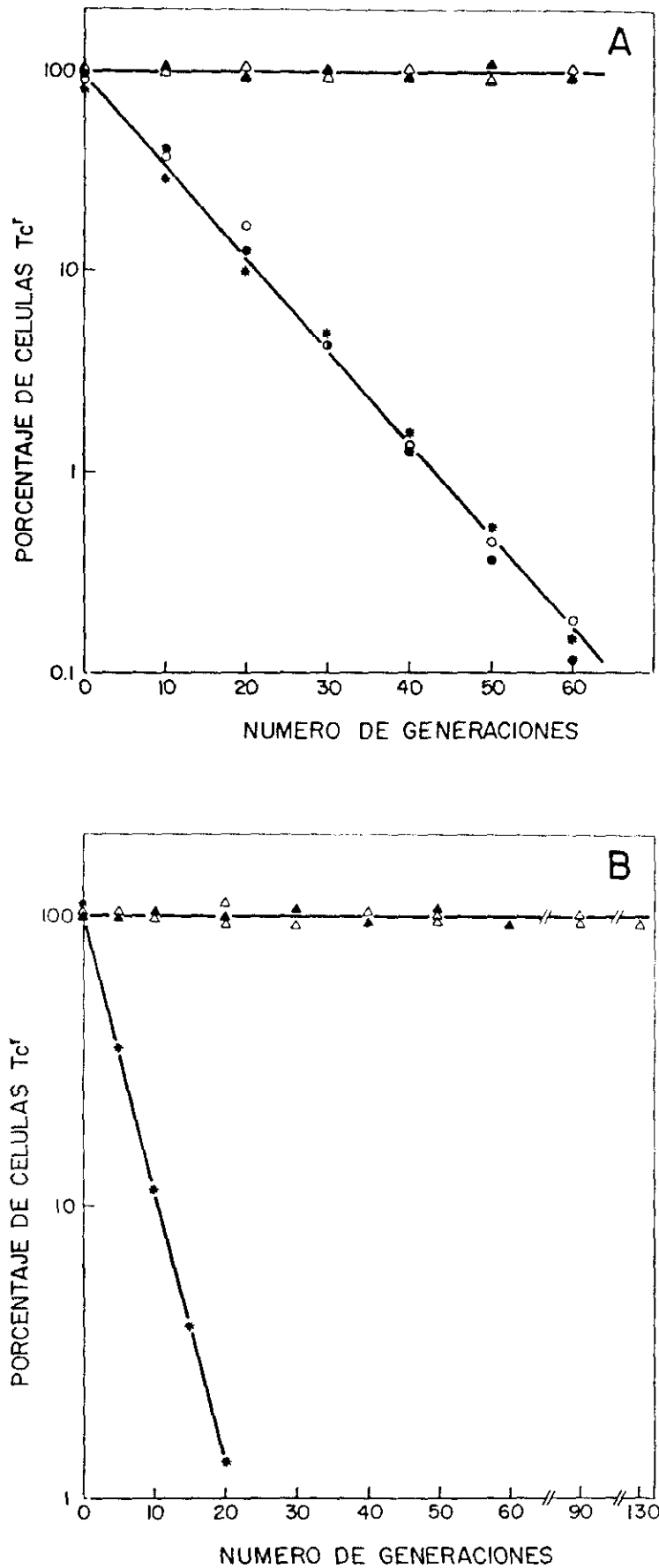


Figura 32. Estabilidad de los derivados que carecen de *ori*(-) en *S.pneumoniae* (A) y en *B.subtilis* (B). La proporción de células con plásmido en cultivos creciendo exponencialmente se determinó como el porcentaje de células Tc^r. Como control, se analizó simultáneamente la estabilidad de pLS1 y pLS5. Símbolos: pLS1 (Δ), pLS5 (\blacktriangle), pLS4 (*), pLS4-t (O), pLS7 (\bullet).

siendo $2n$ el número de copias del plásmido en el momento de la división. Además, en este cálculo teórico no se han tenido en cuenta las formas de ssDNA (muy abundantes para pLS4) que entrarían también en el reparto.

Para determinar si la alta frecuencia de pérdida de pLS4 se debe a la disminución en el número de copias o a la pérdida de algún elemento de estabilidad, analizamos el comportamiento segregacional de pLS7, un plásmido que carece también del fragmento HindIII(3279)-NcoI(4221), pero cuyo número de copias (dsDNA) está en los niveles observados para pLS1. Este plásmido se construyó en pneumococos por ligación de los fragmentos PstI A de pLS4 y PstI B de pLS1*cop7* (en el que se localiza la mutación de copia). Por lo tanto, pLS7 carece del *ori*(-) funcional en pneumococos, no presenta la delección de pLS5 y tiene la mutación *cop7*. Así, pLS7 tiene un número de copias de 19 ± 2 y acumula una cantidad de ssDNA algo superior a la observada para pLS4 (Fig. 30B; las diferencias son poco claras ya que el autorradiograma está saturado). El test de estabilidad de pLS7 en *S.pneumoniae* (Fig. 32A) muestra que el plásmido es inestable y se pierde de la población a la misma velocidad que pLS4 y pLS4-t ($L_{ex} = 0.1$), a pesar de su mayor número de copias.

La siguiente cuestión que se planteaba era saber si la región delecionada en pLS4 influye en la estabilidad de estos plásmidos en *B.subtilis*. Mientras que para pLS1 y pLS5 no hemos detectado pérdidas significativas durante 130 generaciones de crecimiento en medio no selectivo, pLS4 (similar a pLS1 en número de copias y acumulación de ssDNA) segrega rápidamente de la población, con una tasa de pérdida $L_{ex} = 0.2$ por célula y generación (Fig. 32B). En contraste con estos datos, la tasa teórica de pérdida (L_t) para un plásmido de 5 copias que segregara al azar es de 9.7×10^{-4} . Estos resultados, junto con los obtenidos en pneumococos, indican que en ambos huéspedes la segregación de los plásmidos que carecen del fragmento HindIII(3279)-NcoI(4221) es más desventajosa que la esperada por simple reparto al azar, y parece, además, independiente del número de copias.

Características de la secuencia de nucleótidos en la región delecionada en pLS4.

En la región incluida en la delección de pLS4, alrededor de la coordenada 4170, habíamos localizado uno de los tres sitios sensibles a S1 mayoritarios a 10°C (Fig. 25), que podría corresponder a una larga estructura secundaria predicha por el ordenador (Fig.

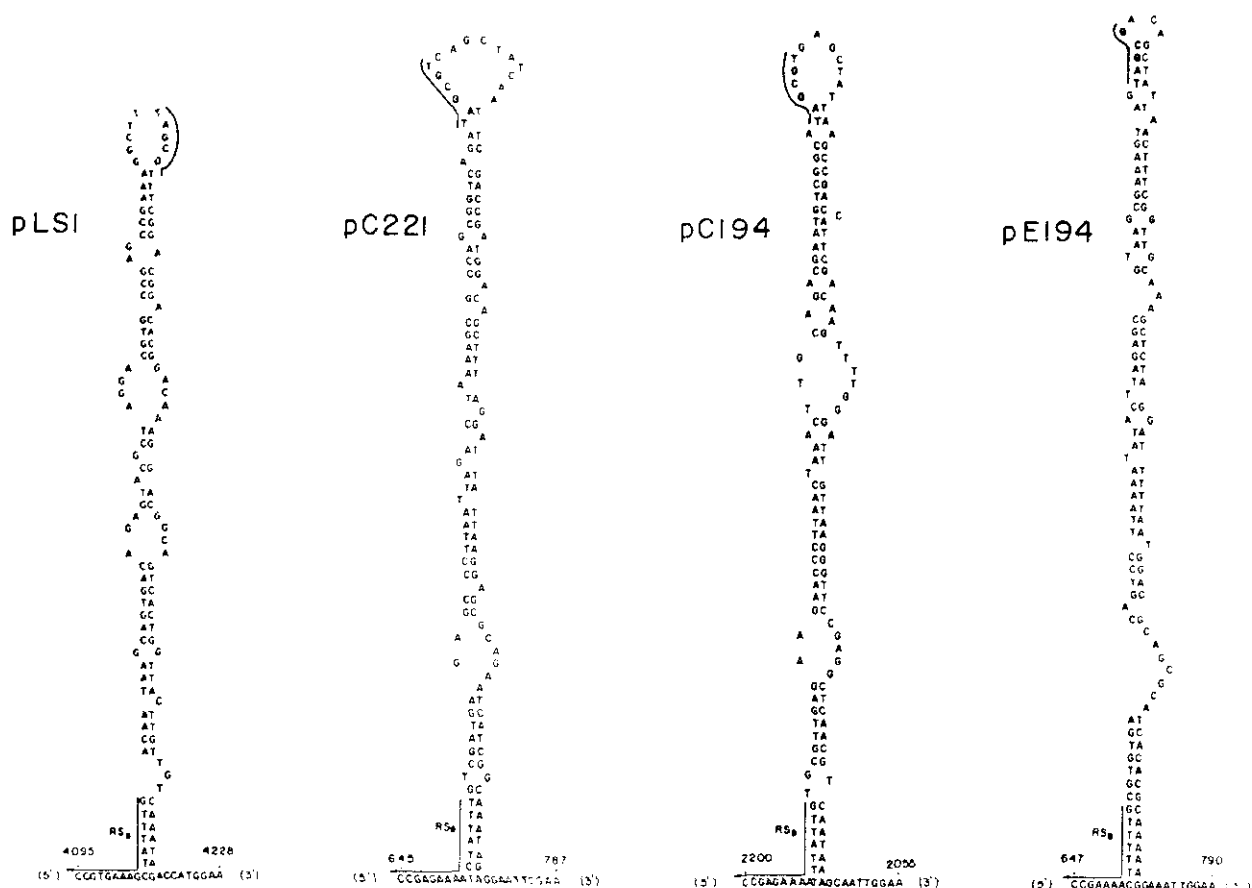


Figura 33. Estructuras propuestas para el *ori(-)* de pLS1 y para los elementos homólogos de algunos plásmidos de *S. aureus*. Las configuraciones mostradas han sido generadas mediante análisis por computador y posterior refinamiento a mano. Se han subrayado las secuencias conservadas en la base izquierda del tallo (RS_B) y en el lazo (consenso de seis bases) de cada una de las estructuras. Las coordenadas mostradas se han tomado de las secuencias dadas por Lacks y cols (1986), Projan y cols (1985), Horinouchi y Weisblum (1982b), y Horinouchi y Weisblum (1982a).

33). La repetición invertida que puede dar lugar a esta estructura se extiende entre las coordenadas 4104 y 4219 de pLS1 y está centrada entre los nucleótidos 4159 y 4160. Este elemento podría ser, por lo tanto, la señal para la iniciación de la síntesis de la cadena retrasada, proceso en el cual los intermediarios de cadena sencilla se convertirían en formas de cadena doble.

En otros plásmidos de bacterias gram-positivas se había mencionado la existencia de largos palíndromes a los que, hasta aquel momento, no se les había asignado ninguna función (Projan y cols, 1985). Mediante análisis por computador de estructuras secundarias encontramos que, al menos tres plásmidos de estafilococos (pC221, pC194 y pE194), podían formar estructuras tallo-lazo similares a la de pLS1 y que, como ésta, presentaban lazos y desapareamientos interiores (Fig. 33). Una característica de todas estas estructuras (incluida la de pLS1) es la presencia de una secuencia muy conservada

en uno de los extremos de la base del tallo. Esta secuencia, denominada RS_B , había sido definida para los plásmidos de estafilococos como un sitio específico de recombinación para la formación de cointegrados entre plásmidos no homólogos (Novick y cols, 1984). En la Figura 33, la cadena representada para pLS1 y pC194 corresponde a la hebra que aparece como ssDNA (este trabajo; te Riele y cols, 1986a), ya que ésta es la que debe poseer la señal para la conversión a dsDNA. De esta manera, el RS_B queda situado en el extremo 5' de la estructura secundaria y la secuencia de DNA de esta región es homóloga en ambos plásmidos. Como para pC221 y pE194 no se había definido la cadena correspondiente al DNA monocatenario, decidimos representar la que tenía homología en el RS_B con la cadena (+) de pLS1, de forma que RS_B y palíndromo quedaron orientados como en este plásmido. La búsqueda de homologías entre el palíndromo de pLS1 y los de los otros tres plásmidos revela, además del RS_B y de las bases complementarias a éste en el extremo 3' del tallo, una secuencia común: 5'-TAGCGT-3', que aparece en el lazo de la horquilla de todos estos plásmidos, exceptuando pE194,

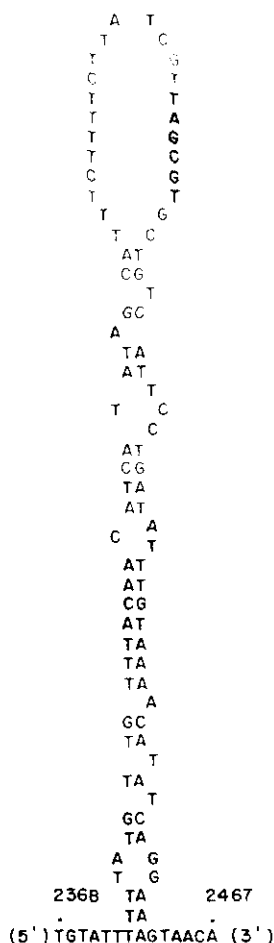


Figura 34. Estructura secundaria propuesta como señal alternativa de conversión de ssDNA a dsDNA. La configuración ha sido generada mediante análisis por computador. En el lazo de la estructura se localiza la secuencia consenso de seis bases (en negritas).

para el que se observa un cambio de una sola base (A en lugar de T) (Fig. 33). Esta secuencia conservada puede ser un elemento funcional importante de estos palíndromes. El posible significado de la localización de dicha secuencia en una región desapareada se planteará en la Discusión.

Dado que en *S. pneumoniae* la delección del *ori*(-) de pLS1 altera la replicación del plásmido, pero no la impide totalmente, debe existir un sitio o mecanismo alternativo (menos eficiente) para la iniciación de la cadena retrasada. Basándonos en las características del *ori*(-) genuino, pusimos una serie de condiciones a la existencia de un posible sitio alternativo: debería poder formar una estructura secundaria en cuyo lazo se localizara la secuencia consenso, y además esta secuencia debía estar en la cadena (+). Una búsqueda con computador en el DNA de pLS1 muestra la existencia de 5 secuencias consenso, aparte de la que se encuentra en el *ori*(-). Dos de ellas están en la cadena complementaria y, en consecuencia, no podrían funcionar como parte de una señal de conversión. Otras dos están en la cadena apropiada (coordenadas 149 y 1810, respectivamente) pero no encontramos ningún palíndrome asociado. La última se localiza en la coordenada 2419, en el lazo de una posible estructura secundaria que se encuentra incluida en el gen *tet* (Fig. 34). Esta estructura podría corresponder a un sitio minoritario sensible a S1 que habíamos localizado hacia el nucleótido 2300, ya que es el único

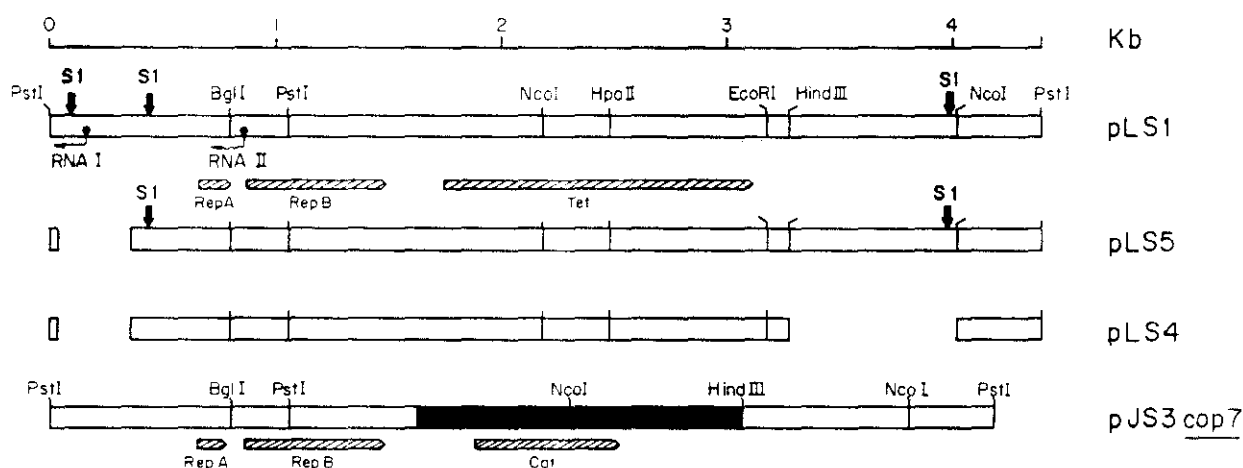


Figura 35. Mapas de varios plásmidos basados en el replicón pLS1 y localización en ellos de los sitios sensibles a S1. Sólo se indican los sitios de restricción relevantes para esta parte del trabajo. Los huecos en los mapas representan las regiones delecionadas en pLS5 y pLS4. El plásmido pJS3_{cop7} corresponde, básicamente, a pLS1_{cop7} con el gen *tet* sustituido por el gen *cat* de pC194; la parte en negro representa el DNA de pC194. Los polipéptidos sintetizados por los distintos genes se presentan en rayado, con el extremo agudo correspondiendo al C-terminal de las proteínas. Las flechas onduladas representan el putativo RNA I y el ctRNA II. Los sitios principales de acción de S1 a 10°C (flechas negras) se indican sólo sobre los plásmidos en cuyos DNAs han sido identificados.

denominadas *repA* y *repB*, que codificarían polipéptidos de 45 y 210 aminoácidos, respectivamente. Una secuencia S.D. típica y potencialmente fuerte (5'-GAGAGG-3') precede al putativo codón de iniciación de *repA* (ATG en 655, Fig. 36). Por el contrario, para *repB* no se encuentra ningún sitio convencional de unión a los ribosomas, pero el codón de iniciación (coordenada 853) está precedido por la secuencia 5'-ATTTCT...(4 o 5 nts)...TATA...(9 o 10 nts)-3', la cual se ha propuesto como sitio atípico de unión a ribosomas (a.r.b.s.). Esta misma secuencia se ha encontrado también en otros genes de *S.pneumoniae* (Mannarelli y cols, 1985; Lacks y cols, 1986). Delante de *repA* se localizan, por homología con la secuencia consenso para los sitios de unión de la RNA polimerasa de *E.coli*, dos posibles promotores solapantes (Fig. 36). Delante de *repB* no se había

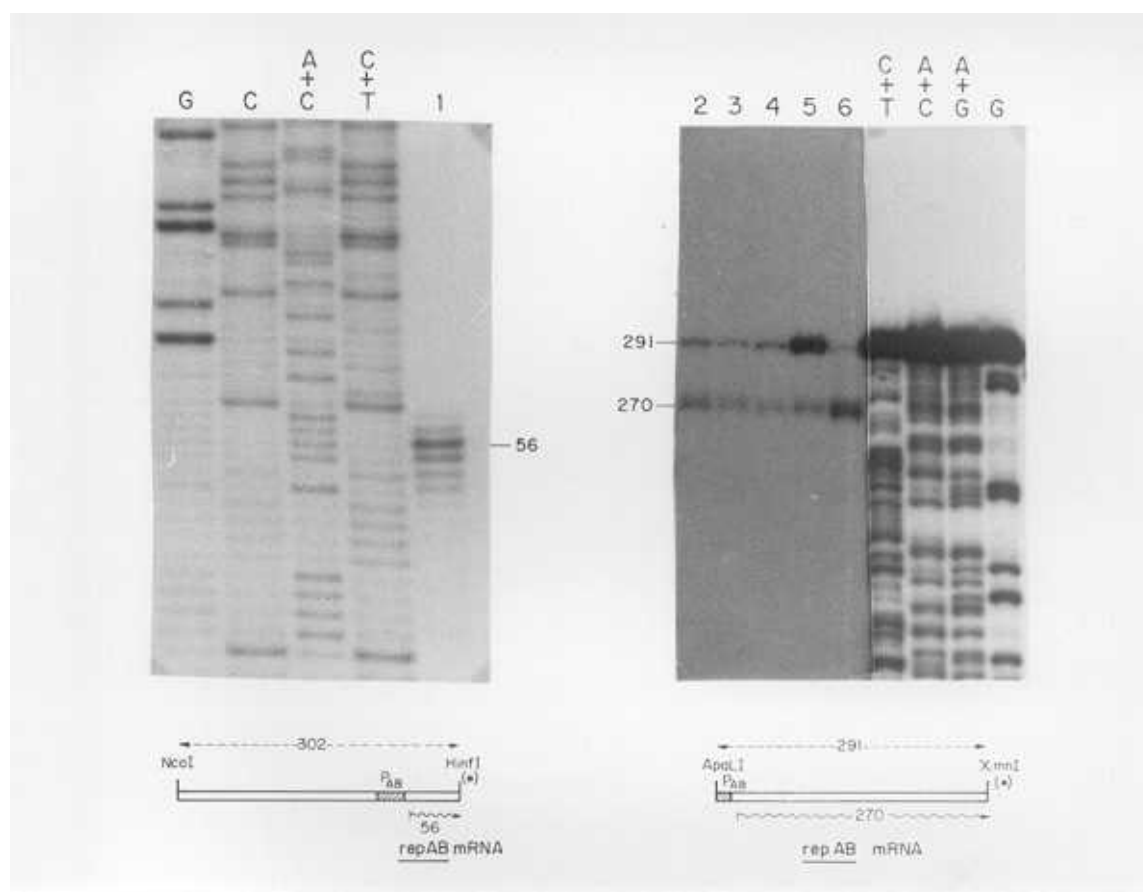


Figura 37. Mapeo del sitio de iniciación del mRNA *repAB*. Los oligonucleótidos protegidos frente a la digestión con S1 por el mRNA *repAB* proceden de dos sondas distintas: fragmento NcoI-HinfI (302 pb) de pLS1Δ24, marcado en el extremo 5' generado por HinfI (calle 1); y fragmento ApaLI-XmnI (291 pb) de pLS1, marcado en el extremo 5' generado por XmnI (calles 2 a 6). Se utilizaron, en cada ensayo, 200 μg de RNA total aislado de pneumococos que contienen pLS1 (calles 1 a 3 y 4, 5; dos preparaciones independientes) o pLS1cop7 (calle 6). La hibridación se realizó a 45°C (calles 2 y 5), 46°C (calles 3, 4 y 6) o 48°C (calle 1). El DNA protegido se analizó mediante electroforesis en geles de secuenciación al 8% de PAA (parte izquierda), o al 6% de PAA (parte derecha). Como controles, se corrieron las reacciones químicas de secuenciación de los DNAs usados como sonda. Los esquemas inferiores muestran los fragmentos empleados como sonda, indicándose su tamaño, el extremo marcado con ³²P (*), y los tamaños esperados para los protegidos por el mRNA *repAB* (↗) sintetizado a partir del promotor P_{AB} (▭).

podido identificar, por el contrario, ninguna secuencia promotora típica, por lo que no podíamos descartar que este gen formara parte de la misma unidad transcripcional que *repA*.

Determinación del sitio de iniciación del mRNA *repAB*.

Para saber si *repA* y *repB* se transcriben realmente, y para determinar los sitios de iniciación de los mRNAs de ambos genes, realizamos ensayos de protección frente a nucleasa S1. Para ello, se preparó RNA total de cultivos de *S.pneumoniae* 708 conteniendo pLS1 o pLS1*cop7*. Como sondas se utilizaron dos fragmentos de DNA distintos, según que el ensayo estuviera encaminado a determinar el punto de iniciación del mRNA *repA* o el del mRNA *repB*. En el primer caso, se utilizó el fragmento de 302 pb NcoI-HinfI (4221-685, según numeración de pLS1) de pLS1 Δ 24, marcado radiativamente en el extremo 5' correspondiente al sitio HinfI (situado dentro de *repA*; véase Fig. 39). Después de permitir la hibridación (a 48°C) de este fragmento con el RNA total procedente de pneumococos que contienen pLS1, se realizó el tratamiento con S1. Los fragmentos de la cadena de DNA marcada protegidos frente a la acción de S1 por hibridación con RNA se muestran en la Figura 37. Estos protegidos son suficientemente pequeños como para determinar con precisión su tamaño. Tras descontar 1.5 nts a las bandas obtenidas por S1 para correlacionarlas con las bandas resultantes de las reacciones químicas de secuenciación del mismo fragmento, se observa que el protegido mayoritario tiene 56 nts (calle 1). Esto permite definir el punto de comienzo de la transcripción en el residuo A en la coordenada 633. Las bandas minoritarias de diferente longitud podrían deberse a artefactos descritos en la actuación de la nucleasa S1 (Sollner-Webb y Reeder, 1979). Aunque, debido a la proximidad de los dos posibles promotores solapantes, los resultados obtenidos no permiten distinguir cuál de ellos está siendo utilizado para la

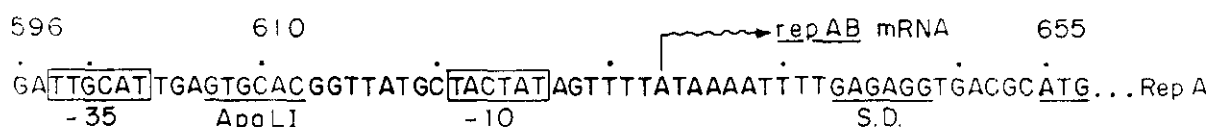


Figura 38. Secuencia de DNA de la cadena codificante de pLS1 en la región del promotor P_{AB} propuesto. Se indica el punto de iniciación del mRNA *repAB*, determinado en los experimentos mostrados en la Figura 37. Las cajas -35 y -10 del promotor P_{AB} se han recuadrado. Entre ambas se localiza el sitio de reconocimiento de ApaLI. También se indican el S.D. y el codón de iniciación de *repA*.

transcripción de *repA*, nos inclinamos por el que se encuentra algo más alejado del gen (Fig. 38), tanto por mostrar un espaciado consenso (Rosenberg y Court, 1979) de 17 pb entre las cajas -35 y -10 (frente al corto espaciado de 15 pb que exhibiría el putativo promotor proximal), como por la localización del sitio de iniciación de la transcripción a 7 pb del final de la caja -10, distancia mucho más frecuente que los 4 pb que mediarían si se utilizara el promotor contiguo.

Para determinar el extremo 5' terminal del mRNA *repB* y conocer de esta forma si *repA* y *repB* se cotranscriben, utilizamos como sonda un fragmento diferente de DNA que incluye el gen *repA* entero y el comienzo de *repB*. Se trata del fragmento de 291 pb ApaLI(607)-XmnI(902) de pLS1, marcado en el extremo 5' correspondiente a XmnI, dentro de *repB* (véase Fig. 39). La hibridación de este fragmento con el RNA total procedente de células que llevan el plásmido pLS1 se realizó a dos temperaturas (45°C o 46°C). Tras el tratamiento con nucleasa S1 sólo se observan, en cualquiera de las muestras, dos bandas marcadas radiactivamente (Fig. 37, calles 2 a 5), una de las cuales corresponde al fragmento de DNA sonda renaturalizado, y la otra a un fragmento protegido de unos 270 nts. Este último identificaría un mRNA cuyo extremo 5' terminal coincidiría con el mRNA *repA*. Cuando en estos ensayos se utiliza RNA total extraído de células que contienen pLS1*cop7* (Fig. 37, calle 6), se observa un fragmento protegido del mismo tamaño que el detectado en los experimentos anteriores, en los que el RNA procedía de células que llevan el plásmido silvestre. No obstante, la intensidad de la banda está aumentada unas 8 veces, según se determinó por análisis densitométrico del autorradiograma (compárense las muestras de las calles 4 y 6, sometidas a las mismas condiciones experimentales). Esto encaja bien con los datos que se expondrán más adelante, acerca de la función del producto del gen *repA*: la mutación *cop7*, que afecta a este gen, conduce a un aumento de unas 5 veces en el número de copias del plásmido, debido a que la proteína RepA mutante tiene alterada su función de inhibición de la síntesis del mRNA *repAB*.

En ninguno de los experimentos anteriores habíamos detectado bandas que pudieran corresponder a un mRNA que llevara únicamente el mensaje de *repB*. Tampoco obtuvimos ninguna evidencia de la existencia de un promotor exclusivo de *repB* en experimentos en los que se utilizó como sonda el fragmento StyI(758)-XmnI(902) de pLS1 marcado en el extremo 5' generado por corte con XmnI, ni siquiera tras largos períodos de exposición autorradiográfica (no se muestra). Todos estos resultados indican que la mayoría del mRNA *repB* (si no todo) se sintetiza, *in vivo*, a partir del mismo promotor que el mRNA *repA*. A este promotor le denominaremos, en adelante, P_{AB}.

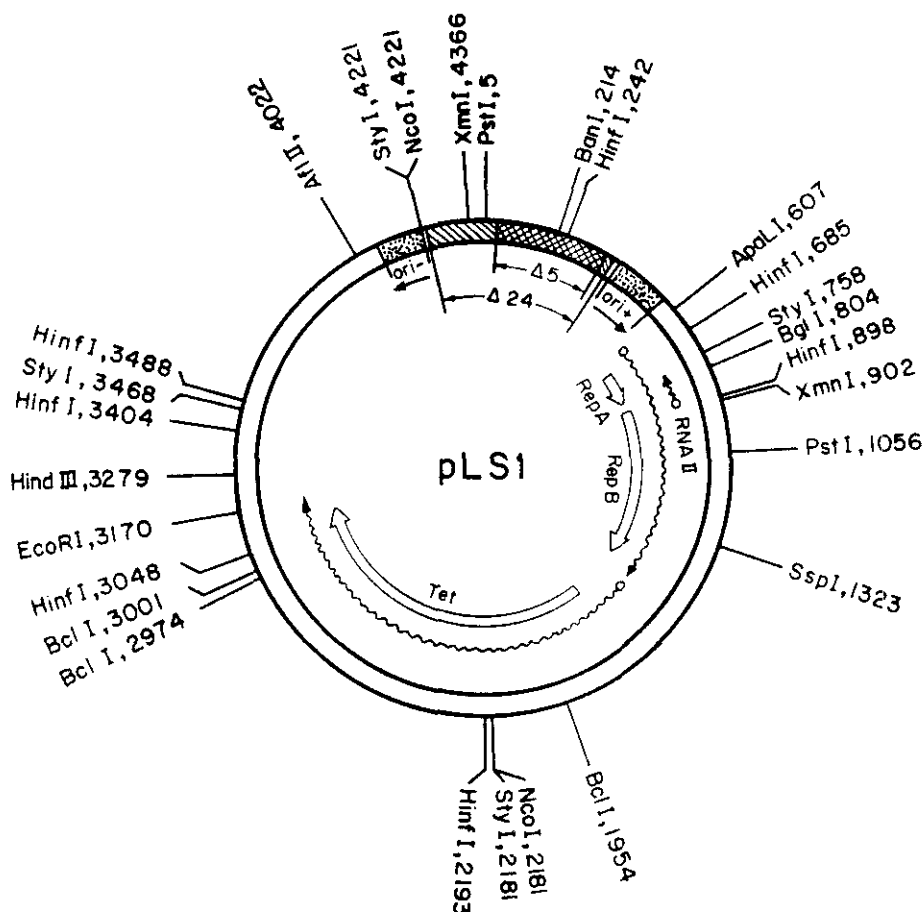


Figura 39. Mapa físico y funcional de pLS1. Se muestran los sitios de restricción pertinentes y sus coordenadas de corte. La dirección de síntesis de las cadenas líder [a partir del *ori*(+)] y retrasada [a partir del *ori*(-)], así como la localización y extensión de las regiones delecionadas en pLS5 ($\Delta 5$) y pLS1 $\Delta 24$ ($\Delta 24$) se indican en el interior. También se muestran los transcritos y productos génicos determinados por pLS1, con la siguiente representación: promotores (o), RNAs (\sim), polipéptidos (\Rightarrow); las flechas señalan la dirección de síntesis.

El mRNA *repAB* podría extenderse hasta la coordenada 1558, donde se localiza una secuencia que podría dar lugar a un terminador transcripcional rho-independiente (Fig. 6). Un mapa físico y funcional de pLS1, indicando la posición relativa del mRNA *repAB* con respecto al mRNA *tet* y a los orígenes de las cadenas líder y retrasada, se muestra en la Figura 39.

En tanto que el gen *repA* es dispensable para el plásmido (de hecho hemos construido derivados delecionados de pLS1 que carecen totalmente de él), el gen *repB* es esencial, aunque su producto génico puede ser complementado *in trans*. El producto del gen *repB* es, según indican todos los resultados, la proteína iniciadora de la replicación. *In vitro*, RepB exhibe actividades endonucleasa y tipo topoisomerasa I, específicas del *ori*(+) de pLS1. Estas actividades han sido descritas, con anterioridad, para la proteína

RepC codificada por pT181, plásmido que también replica por un mecanismo de círculo rodante (Koepsel y cols, 1985). Mediante experimentos que determinan la región protegida por RepB, tanto frente a la digestión con DNasa I como a la rotura causada por radical hidroxilo, se ha mostrado que esta proteína se une a una región de DNA que incluye los tres iterones. Sin embargo, la acción endonucleásica de RepB tiene lugar 85 pb a la izquierda de su región de unión (Fig. 28), ya que la proteína produce una rotura de cadena sencilla entre los nucleótidos 448 y 449 (G/A) de la cadena codificante de pLS1 (de la Campa y cols, 1990).

Hiperexpresión de *repB*.

Para la identificación y posterior purificación de RepB se utilizaron una serie de derivados plasmídicos basados en el vector pET5 (el origen y características de este vector de expresión se describieron en el apartado 20 de Métodos). El plásmido pLS21 es un híbrido compuesto por pLS5 y pET5, unidos en sus respectivos sitios EcoRI únicos. Para identificar de forma inequívoca los distintos productos génicos especificados por pLS1, se construyeron una serie de derivados delecionados de pLS21. Los mapas físicos

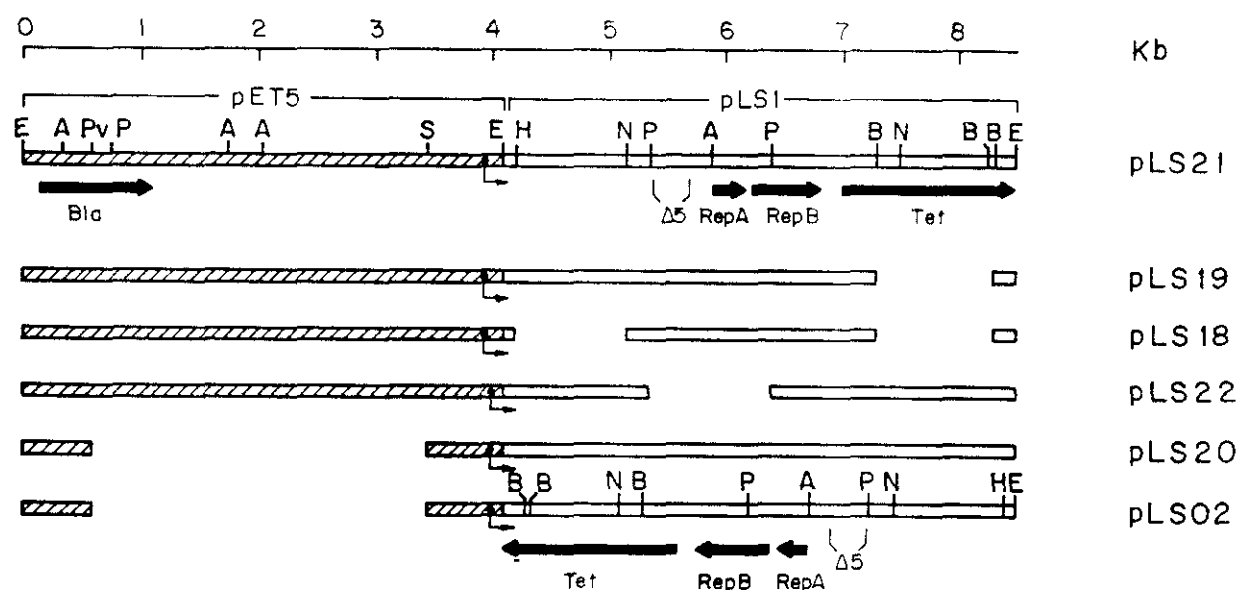


Figura 40. Mapas de los plásmidos basados en pET5 utilizados en este trabajo. Se indica la posición del promotor $\phi 10$ y su dirección de transcripción (\blacktriangleleft). El plásmido pLS21 es un híbrido entre pET5 y pLS5; en su mapa se muestra la región del DNA de pLS1 eliminada en pLS5 ($\Delta 5$), y los sitios de restricción pertinentes (E: EcoRI, A: ApaLI, Pv: PvuII, P: PstI, S: Sall, H: HindIII, N: NcoI, B: BclI). A partir de pLS21 se han construido una serie de derivados que permiten la identificación de los distintos productos génicos (\blacktriangleright). Las regiones delecionadas en los diferentes plásmidos se muestran como zonas huecas. Los plásmidos pLS20 y pLS02 se diferencian en la orientación del DNA de pLS5 con respecto al promotor $\phi 10$.

de todos estos plásmidos se presentan en la Figura 40. El plásmido pLS20, construido por delección del fragmento pequeño PvuI-SalI, carece de la mayor parte del DNA de pET5, incluido el gen *bla*, lo que permite la identificación del producto de este gen. La identificación de los productos génicos de *repA* y *repB* fue posible gracias a la utilización de pLS22, en el que se ha eliminado la región de DNA correspondiente al fragmento PstI B de pLS5. El plásmido pLS22 carece, por tanto, de todo el gen *repA* y de parte del gen *repB*. Por su parte, el plásmido pLS19 se construyó a partir de pLS21 por delección del fragmento BclI B situado en el interior del gen *tet* de pLS5. A partir de pLS19 se construyó el plásmido pLS18 por eliminación del mismo fragmento HindIII-NcoI del que carece pLS4 (coordenadas 3279 a 4221 en la secuencia de pLS1). En el fragmento eliminado en pLS18 mapea la casi totalidad de la *orf D* de pLS1 (Lacks y cols, 1986). Este frente continúa abierto y tiene su promotor en el fragmento EcoRI B de pMV158 (Priebe y Lacks, 1989). Aunque en pLS1 la *orf D* carece de promotor, en los plásmidos pLS21 y derivados (pLS19, pLS20 y pLS22) queda situada bajo el control del promotor $\phi 10$ del fago T7, lo que permite identificar el producto génico de la *orf D* por comparación entre los polipéptidos especificados por estos plásmidos y los correspondientes a pLS18 (que carece de la *orf D*). Por último, el plásmido pLS02 se construyó a partir de pLS20 por reorientación del fragmento EcoRI correspondiente a pLS5 con respecto al promotor $\phi 10$. En esta construcción, ninguna de las *orfs* de pLS1 será, pues, hiperexpresada tras la inducción del sistema.

El plásmido pET5 es relativamente estable, y es retenido por una elevada fracción de las células huéspedes tras el crecimiento durante muchas generaciones en ausencia de selección. Sin embargo, cuando se clona en pET5 un gen cuyo producto es tóxico para la célula huésped, se puede producir en el cultivo la selección de células que hayan perdido el plásmido o que contengan un sistema no funcional (Studier y cols, 1989). El problema de la inestabilidad plasmídica tiene especial relevancia cuando el mantenimiento del plásmido sólo puede asegurarse por selección para Ap^r. En este caso, cultivos densos producen suficiente β -Lactamasa como para destruir altas concentraciones de Ap, lo que permite el crecimiento de células sin plásmido. Por ello, es importante realizar la inducción de los cultivos antes de que su DO sea demasiado alta, de forma que se evite el desplazamiento de los cultivos de interés por células no funcionales que hayan perdido el plásmido. Para saber si la hiperexpresión de genes de pLS1 podía dar lugar a este tipo de problemas, hemos probado la funcionalidad del sistema (empleando las distintas construcciones plasmídicas) en cultivos crecidos hasta dos DO distintas (0.4 y 0.8). Los cultivos fueron preparados por dilución 1/2000 de un preinóculo congelado (a -70°C) a baja DO (0.2 o 0.3). Estas pruebas se realizaron también con cultivos crecidos

sucesivamente hasta saturación (6 o 7 pases). La presión de selección aplicada durante el crecimiento de los cultivos fue de 200 $\mu\text{g/ml}$ de Ap para los que contienen pLS18, pLS19 o pET5, y de 10 $\mu\text{g/ml}$ de Tc en el caso de pLS20. Para pLS21 y pLS22, que determinan resistencia a ambos antibióticos, los cultivos se crecieron en presencia de Ap, o de Tc. Los resultados de estos tests muestran que, en algunos casos, los sistemas mantienen su funcionalidad con independencia de la DO alcanzada por los cultivos, aunque éstos hayan llegado a saturación sucesivas veces, como ocurre con pET5 y pLS20, y también con pLS21 y pLS22 si se aplicó selección para Tc'. Los porcentajes de células con plásmido, de células que carecen de un sistema funcional y de las que presentan plásmidos mutantes no funcionales son, respectivamente, 100%, 0.1% y 0.005% para pET5, y de aproximadamente 100%, 0.8% y 0.08% para los otros tres plásmidos, a cualquiera de las DO y condiciones de crecimiento ensayadas. Por el contrario, para pLS18, pLS19, pLS21 y pLS22 (con selección para Ap'), se observa una pérdida de funcionalidad del sistema en cultivos muy crecidos, que parece deberse, fundamentalmente, a la pérdida de estos plásmidos, según se desprende de los resultados de los tests: a DO 0.4, prácticamente el 100% de las células conservan el plásmido, un 1.5% son no funcionales y un 0.07% conservan el plásmido aunque han perdido la funcionalidad. Cuando los cultivos se crecen hasta DO 0.8, la mayoría de las células conservan el plásmido (97%), aunque el porcentaje de células no funcionales se incrementa al doble (3%), en tanto que el porcentaje de células con plásmidos no funcionales apenas varía (0.08%). Sin embargo, en cultivos llevados sucesivamente a saturación es donde se observa más claramente la pérdida de funcionalidad de los sistemas seleccionados para Ap'. Así, tras 6 crecimientos sucesivos a saturación, sólo un 25% de las células conservan el plásmido, alrededor de un 80% carecen de sistema funcional y aproximadamente un 5% son mutantes que conservan el plásmido pero han perdido la capacidad de expresión del sistema. Como hemos apuntado antes, de todos estos datos se deduce que la gran mayoría (95%) de las células carentes de sistema funcional lo son por pérdida del plásmido, en tanto que sólo un pequeño porcentaje de las mismas son mutantes afuncionales con plásmido.

Para conseguir la máxima síntesis de las proteínas de interés (en este caso RepB) hemos probado varias de las construcciones mencionadas, ensayando asimismo distintas condiciones de inducción del sistema en cultivos a pequeña escala. El protocolo general seguido en todos los casos se describe en el apartado 20 de Métodos. En primer lugar nos planteamos la DO a la que inducir los cultivos, la concentración de IPTG que debía añadirse y la conveniencia de la adición de Rif a los cultivos inducidos. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Figura 41. RepB se ha identificado

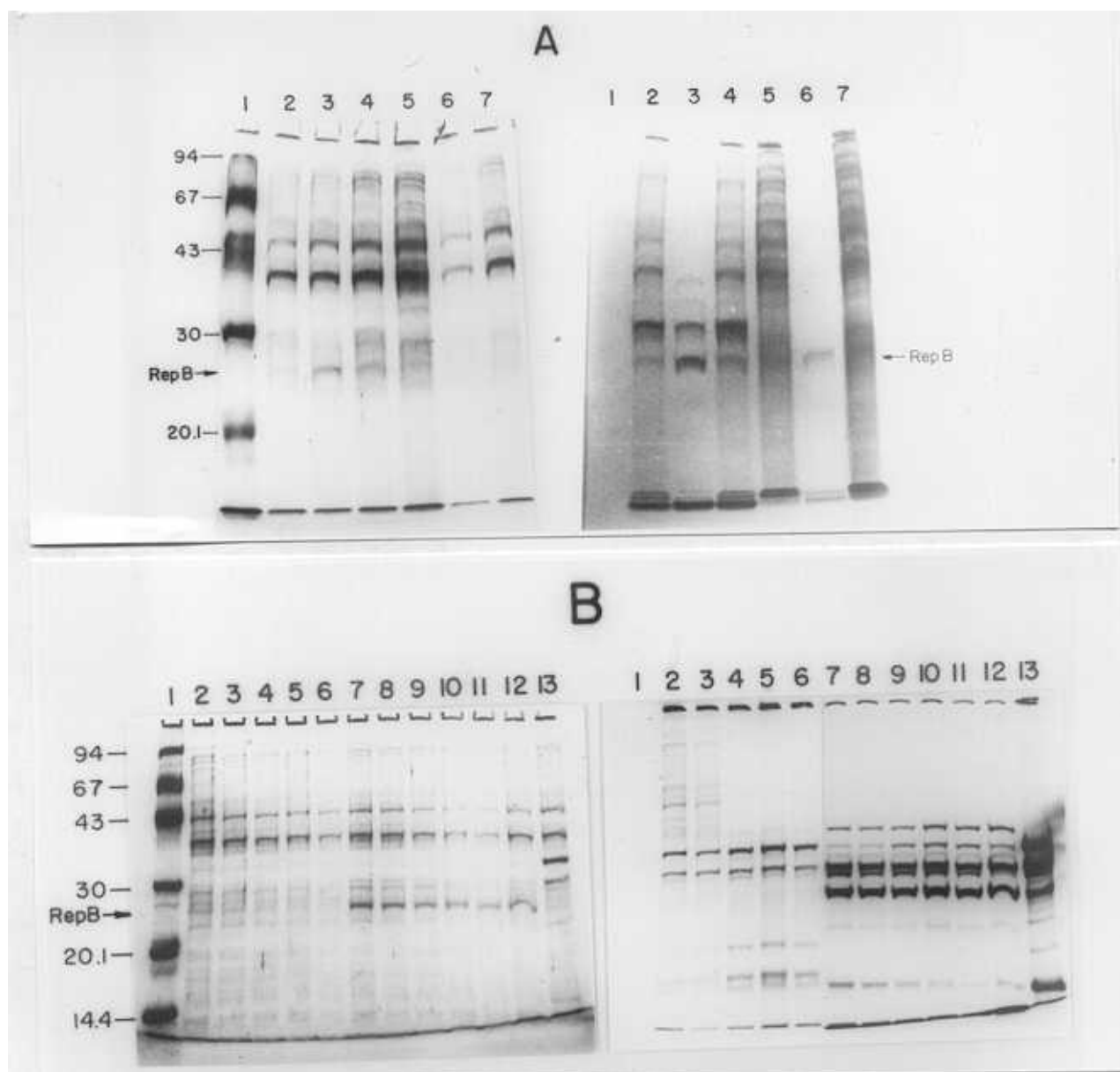


Figura 41. Identificación de RepB y optimización del sistema para su hiperproducción. **A**, efecto de la concentración de IPTG y de la adición de Rif sobre la síntesis de RepB. El sistema de hiperexpresión génica de cultivos que contenían pLS19 (calles 2 a 4) o pLS20 (calles 5 a 7) se indujo por adición de IPTG 0.5 mM (calles 2, 3, 5 y 6) o 1 mM (calles 4 y 7). Algunos cultivos (calles 2, 4, 5 y 7) se incubaron durante 120 min con la sola presencia del inductor. Otros cultivos (calles 3 y 6) fueron tratados durante 30 min con IPTG, antes de la adición de Rif y posterior incubación durante 90 min más. Para todos ellos, tras un pulso de marcaje con [35 S]-metionina, las células se lisaron y las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE al 12% de PAA. Se muestra el gel teñido con CBB (parte izquierda) y el autorradiograma del mismo gel (parte derecha). En ambos se indica la banda correspondiente a RepB. En la calle 1 se corrieron proteínas estándar no marcadas radiactivamente (fosforilasa b, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de la tripsina y α -lactoalbúmina), cuyos pesos moleculares (en kDa) se indican a la izquierda. **B**, Inducción del sistema en cultivos crecidos hasta distintas DO. Cultivos conteniendo pLS22 (calles 2 a 6), pLS19 (calles 7 a 12), o pET5 (calle 13) fueron crecidos hasta DO de 0.3 (calles 5, 6, 10 y 11), 0.4 (calles 4, 9, 12 y 13), y 0.5 (calles 2, 3, 7 y 8). La inducción de los sistemas se realizó por tratamiento con IPTG 1 mM durante 7 min, seguido de adición de Rif e incubación durante 60 min más. Muestras marcadas mediante un pulso con [35 S]-metionina fueron sometidas a SDS-PAGE en gradiente del 10 al 15% de PAA. Se muestra el gel teñido con CBB (parte izquierda) y el autorradiograma del mismo (parte derecha). En este último, el tiempo de exposición de las muestras correspondientes a pLS22 (calles 2 a 6) fue cinco veces mayor que para el resto de las muestras. En la calle 1 se corrió el marcador de peso molecular utilizado en A. La posición de la banda correspondiente a RepB está indicada. El volumen de muestra aplicado en las calles 3, 4, 5, 8, 9 y 10 ha sido corregido para las variaciones en DO de los cultivos.

comparando las proteínas sintetizadas tras la inducción del sistema en las células que contienen pLS19 (en el que *repB* está situado bajo el control de $\phi 10$) y en las que llevan pLS22 (que carece de parte de *repB*). De esta forma, hemos identificado la proteína como una banda de M, 24000 (Fig. 41B, calles 7 a 12), visible tanto entre las proteínas de nueva síntesis (autorradiograma) como entre las proteínas totales (gel teñido con CBB). La banda correspondiente a RepB se observa también entre las proteínas de nueva síntesis especificadas por pLS20 (Fig. 41A, calle 6), plásmido que carece de casi todo el vector pET5 (Fig. 40). Esto confirma que la proteína identificada como RepB está codificada por un gen de pLS5. El empleo de una concentración de inductor doble que la descrita por Studier y Moffatt (1986) para este sistema (1 mM frente a 0.5 mM de IPTG) conduce sólo a un ligero aumento en la eficiencia de síntesis de RepB tras la inducción, que se traduce en una acumulación final algo mayor de dicha proteína (Fig. 41A, compárense calles 2 y 4, y 5 y 7). La principal mejora se produce, sin embargo, por la adición de Rif (200 $\mu\text{g/ml}$) a los cultivos inducidos. Así, se realizaron ensayos en los que se permitió la inducción del sistema (empleándose pLS19 o pLS20) con IPTG 0.5 mM durante 30 min, y a continuación los cultivos se trataron con el antibiótico durante 90 min antes de recoger las células. Tras este tratamiento, la síntesis *de novo* de RepB está muy incrementada (Fig. 41A, calles 3 y 6 en autorradiograma), especialmente en células que contienen pLS19, en las que se observa una acumulación considerable de la proteína (calle 3 en gel teñido para proteínas). Otra ventaja importante del tratamiento con Rif es que se consigue una síntesis específica de las proteínas codificadas por genes plasmídicos bajo el control del promotor $\phi 10$. Esto, aparte de disminuir el fondo de proteínas celulares, tiene gran importancia a la hora de purificar una proteína, pues la especificidad de la marca radiactiva incorporada tras el tratamiento permite la fácil identificación y localización de la proteína en cuestión a lo largo de las distintas etapas de la purificación. Por último, la adición de Rif a los cultivos inducidos evita que éstos sean sobrecrecidos por células que carecen de sistema funcional, que son las únicas capaces de multiplicarse activamente tras la inducción por IPTG.

En la Figura 41B se muestran tanto las proteínas totales como las de nueva síntesis, tras la inducción de cultivos crecidos a distintas DO (0.3, 0.4 y 0.5). En estos ensayos se han estudiado los sistemas basados en los plásmidos pLS19 (calles 7 a 12) y pLS22 (calles 2 a 6). Las condiciones de hiperexpresión fueron: inducción con IPTG 1 mM durante 7 min, seguida de tratamiento con Rif (200 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora. Tras este período, la proteína identificada como RepB es la que presenta mayor tasa de síntesis para pLS19, como se observa por autorradiografía tras el pulso de marcaje con [^{35}S]-metionina. Paralelamente se produce una acumulación significativa de la proteína, que

llega a representar aproximadamente el 10% del contenido proteico total de la célula. En algunos casos (calles 3, 4 y 5 para pLS22 y 8, 9 y 10 para pLS19) la cantidad de muestra cargada se corrigió para las variaciones en DO de los cultivos. No se observan diferencias significativas en el rendimiento de RepB entre cultivos inducidos a cada una de las DO, aunque la síntesis de proteínas inespecíficas parece estar aumentada en el cultivo más denso, especialmente para pLS22 (calles 2 y 3). A partir de estos resultados y de los obtenidos en los tests de funcionalidad, decidimos inducir los cultivos cuando éstos alcanzaran una DO entre 0.4 y 0.45, de forma que consiguiéramos un mayor rendimiento de RepB sin riesgo de pérdida de funcionalidad del sistema. Las proteínas de nueva síntesis en el sistema que contiene pLS22 han sido visualizadas tras una exposición autorradiográfica 5 veces más larga que las correspondientes al sistema con pLS19. Aún así, la expresión inducida del gen *bla* (que codifica la β -Lactamasa) en pLS22 es mucho más pobre que en pLS19, a pesar de que en el momento de la inducción los cultivos que contienen pLS22 (crecidos en presencia de Tc 10 μ g/ml y Ap 100 μ g/ml) presentan prácticamente un 100% de células con sistema funcional. De aquí se desprende que no sólo es importante optimizar el sistema en cuanto a funcionalidad, sino también elegir el plásmido más apropiado para la expresión del gen en cuestión. Hemos comentado antes que RepB se identificó comparando las proteínas sintetizadas específicamente en los sistemas con pLS19 y pLS22 (Fig. 41B). En el sistema con el vector pET5 se observa, tras la inducción y tratamiento con Rif, una proteína de nueva síntesis que presenta una movilidad electroforética similar a la de RepB (Fig. 41B, calle 13), aunque su tasa de síntesis está disminuida con respecto a la de esta proteína. A diferencia de RepB, la proteína especificada por pET5 no se adsorbe a la matriz de heparina-agarosa en presencia de KCl 200 mM. Esta proteína podría corresponder, por su movilidad, a la menor de las bandas asignadas a la β -Lactamasa (Tabor y Richardson, 1985).

Dado que el grado de expresión de un mismo gen varía de un plásmido a otro, no es descabellado pensar que las condiciones óptimas de inducción pueden variar también de un sistema a otro, dependiendo del plásmido empleado. Por esta razón, hemos determinado la eficiencia en la síntesis de RepB para cada una de las construcciones en las que el gen en estudio podía hiperexpresarse, ensayando asimismo distintas condiciones de inducción y tratamiento con Rif. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Figura 42. Para los sistemas basados en los plásmidos pLS18 (calles 3-5) y pLS19 (calles 6-8), los cultivos crecidos hasta una DO de 0.4 se sometieron a uno de estos tres tratamientos: a) inducción con IPTG durante 7 min seguida de adición de Rif e incubación durante 60 min más; b) inducción con IPTG durante 30 min antes de incubar otros 60 min en presencia de Rif; c) incubación durante 90 min (en ausencia de inductor y de

A

B

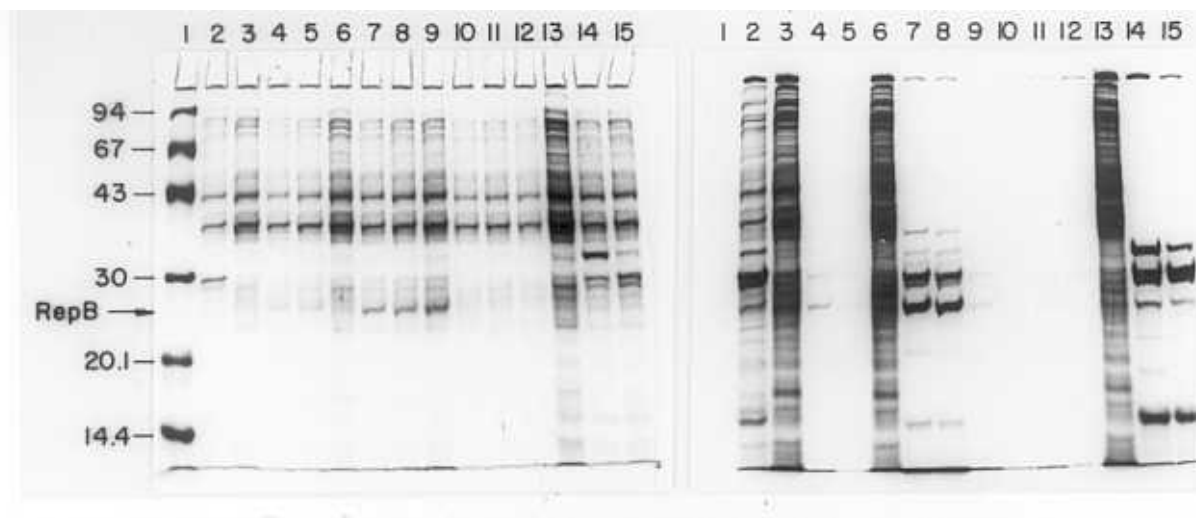


Figura 42. Expresión de *repB* empleando distintos plásmidos y condiciones de inducción. Cultivos conteniendo pLS18 (calles 3 a 5), pLS19 (calles 6 a 8), pLS21 (calles 10 y 11), pLS22 (calle 12) o pET5 (calles 13 a 15) fueron crecidos a DO 0.4 y sometidos a los siguientes tratamientos: incubación con IPTG 1 mM durante 7 min, seguida de adición de Rif e incubación durante 60 min más (calles 4, 7, 10, 12 y 14); incubación con IPTG 1 mM durante 30 min, adición de Rif e incubación durante 60 min más (calles 5, 8, 11 y 15); incubación durante 90 min, en ausencia de inductor y Rif (calles 3, 6 y 13). También se incluyó una muestra en la que un cultivo con pET5, crecido hasta DO 0.4, se trató con IPTG 1 mM durante 120 min (calle 2). Tras el pulso de marcaje con [35 S]-metionina, las células se lisaron y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en gradiente del 10 al 15% de PAA. **A**, gel teñido con CBB. En la calle 1 se corrió la mezcla de proteínas estándar utilizada en la Figura 41, indicándose a la izquierda los pesos moleculares correspondientes. En la calle 9 se incluyó, como control, una muestra procedente de un cultivo con pLS19 incubado con IPTG durante 30 min y con Rif durante 90 min más; la radiactividad de esta muestra ya había decaído. **B**, autorradiograma del mismo gel.

antibiótico). Para pLS19 se incluye también una muestra en la que, tras tratar 30 min con IPTG, se dejó actuar la Rif durante 90 min. Aunque en esta muestra ya había decaído la radiactividad (calle 9 en panel B), sirve para comparar la cantidad de RepB acumulada con respecto a las otras condiciones ensayadas. Como se observa tanto en el gel teñido para proteínas (panel A) como en el autorradiograma (panel B), la mayor eficiencia en la síntesis de RepB corresponde al sistema inducido de pLS19, sin que se observen diferencias apreciables entre los tratamientos de 7 y 30 min con IPTG (calles 7 y 8). RepB continúa sintetizándose de forma activa tras 90 min de actuación del sistema inducido en presencia de Rif (Fig. 42B, calle 9), consiguiéndose una acumulación considerable de la proteína (calle 9 en panel A). En comparación con los resultados obtenidos para pLS19, la síntesis inducida de RepB a partir de pLS18 es mucho menos eficiente. Además, para este plásmido se observa una clara diferencia entre los dos tiempos de inducción con IPTG (Fig. 42A, calles 4 y 5), de forma que las mejores condiciones son las de inducción más corta. Para pLS21 y pLS22 se aprecia, asimismo, una baja expresión de los genes

situados bajo el control del promotor $\phi 10$, incluso tras cortos periodos de inducción (7 min en presencia de IPTG; Fig. 42, calles 10 a 12). Ya que en una serie de casos la hiperexpresión génica parecía aumentar cuando la inducción del sistema se llevaba a cabo durante un breve espacio de tiempo, decidimos ensayar también la adición simultánea de inductor y Rif. En el autorradiograma de la Figura 43 se observan las proteínas que se sintetizan *de novo*, al cabo de 90 min de este tratamiento, a partir de los plásmidos pET5 (calle 1), pLS19 (calle 3), pLS20 (calle 4), pLS21 (calle 6) y pLS22 (calle 7). Para pLS19 se incluye también un extracto de un cultivo inducido con IPTG durante 30 min y tratado a continuación 90 min más con Rif (calle 2). Como se observa, esta muestra es la que presenta la mayor tasa de síntesis de RepB, más aún si tenemos en cuenta que se aplicó en el gel la mitad de volumen que para el resto de las muestras (excepto para pET5, que también fue la mitad). En tanto que para pLS19 el tratamiento simultáneo con inductor y antibiótico (calle 3) da lugar a una expresión más pobre de *repB*, para pLS20 y pLS21 se observa el resultado contrario: estas condiciones son las óptimas para la síntesis de RepB, no apreciándose (para pLS21) diferencias significativas entre la tasa de síntesis tras 60 o 90 min de tratamiento (calles 5 y 6).

A partir de todas las observaciones anteriores decidimos qué sistema y condiciones de hiperproducción emplear para la purificación de RepB: cultivos del sistema BL21(DE3)/pLS19 crecidos en M9+Ap hasta una DO de 0.4, inducidos con IPTG 1 mM durante 30 min, y a continuación incubados 90 min en presencia de Rif (200 μ g/ml) (Figs. 41 a 43)

Purificación de RepB.

Para purificar esta proteína se partió de dos litros de cultivo de la estirpe BL21(DE3) conteniendo el plásmido pLS19. Las condiciones para la síntesis eficiente de RepB fueron las descritas en el párrafo anterior. Las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas con tampón B (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, DTT 5 mM y EG 5%) suplementado con KCl 150 mM, y resuspendidas en 20 ml del mismo tampón. La lisis celular se llevó a cabo haciendo pasar la suspensión dos veces a través de una prensa French a una presión de 138 MPa. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (12000 xg, 20 min), y el sobrenadante se mezcló con 4 ml de extracto de cultivo marcado (35×10^6 cpm de material precipitable por TCA). Para precipitar los ácidos nucleicos se añadieron, gota a gota, 6 ml de una solución de sulfato de estreptomicina al 25%, mientras la mezcla se agitaba suavemente. La agitación se

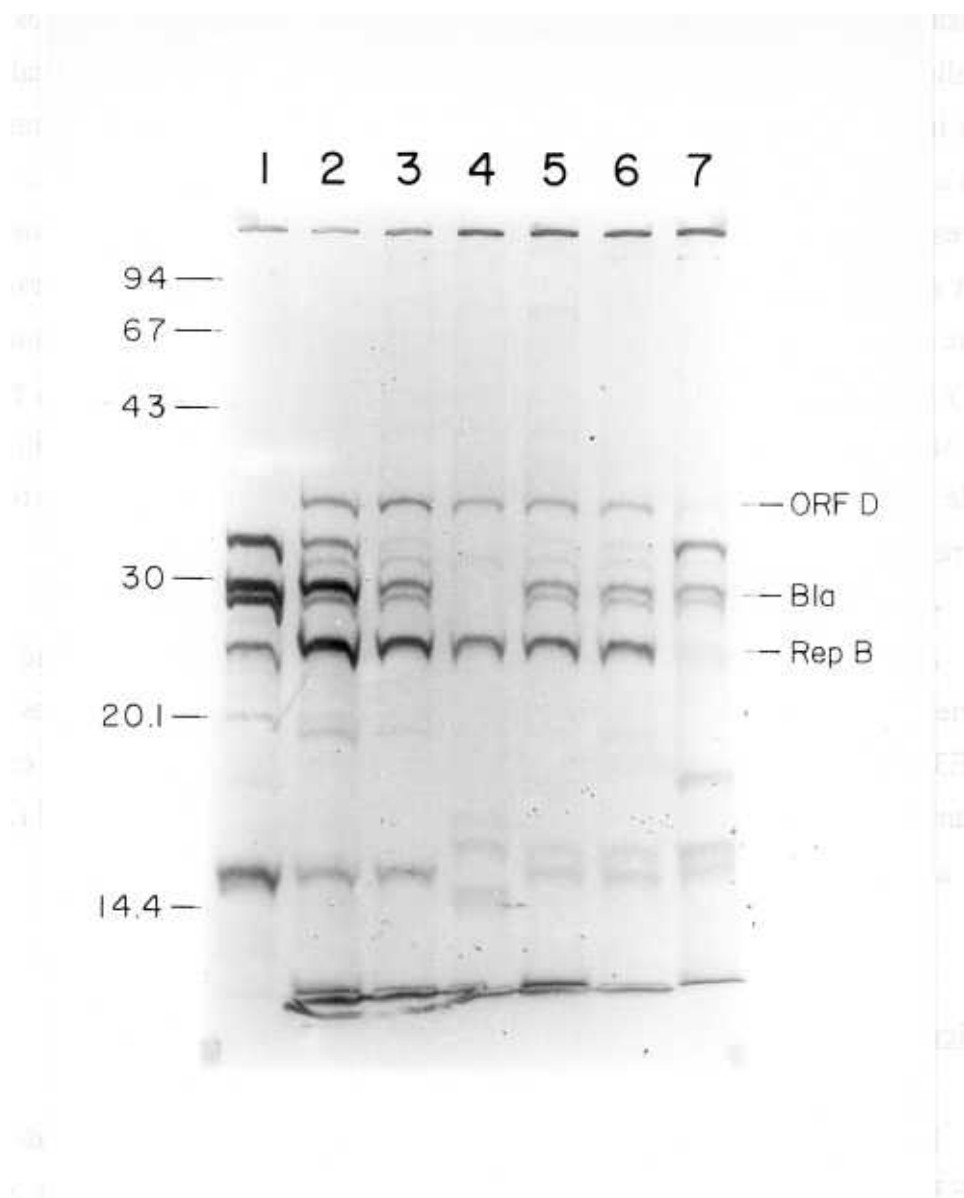


Figura 43. Efecto de la adición simultánea de IPTG y Rif sobre la síntesis de RepB. Cultivos que contenían pET5 (calle 1), pLS19 (calle 3), pLS20 (calle 4), pLS21 (calles 5 y 6) o pLS22 (calle 7), se crecieron a DO 0.4 y se indujeron por adición simultánea de IPTG y Rif. La incubación en estas condiciones se prolongó durante 60 min (calle 5) o 90 min (calles 1, 3, 4, 6 y 7). También se incluye una muestra en la que un cultivo con pLS19 (a DO 0.4) se incubó durante 30 min con IPTG, añadiéndose a continuación Rif y prosiguiéndose la incubación durante 90 min más (calle 2). Tras el pulso de marcaje y la lisis celular, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en gradiente del 10 al 15% de PAA. En las calles 1 y 2, el volumen de muestra aplicado fue la mitad que en el resto de las calles. Se presenta el autorradiograma del gel, indicándose las bandas identificadas como RepB, β -Lactamasa (Bla) y ORF D. A la izquierda, se señala la posición y peso molecular de las proteínas no marcadas usadas como estándar (las mismas que en la Figura 41).

continuó 30 min más a 0°C, y el precipitado fue descartado tras centrifugar a 12000 xg, 30 min, a 0°C. La mayor parte de RepA se eliminó junto con los ácidos nucleicos, probablemente debido a la capacidad de esta proteína para unirse a DNA. A continuación se añadieron, lentamente y mientras se realizaba una agitación constante, 472 mg de sulfato amónico por cada ml de sobrenadante (70% de saturación), manteniendo la mezcla a 0°C. Una vez que la sal se hubo disuelto totalmente, se continuó agitando a la misma temperatura durante 30 min más. El precipitado se recogió por centrifugación en las mismas condiciones que en el paso anterior, y se disolvió en 15 ml de tampón B que contenía KCl 300 mM, dializándose frente a 2 l del mismo tampón (2 cambios, 4 h cada vez). Tras este proceso, el contenido de la bolsa de diálisis presentaba un aspecto ligeramente turbio, y fue centrifugado para separar las proteínas precipitadas de las solubles en estas condiciones de sal. Las proteínas presentes en sobrenadante y sedimento se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig. 44A). RepB se encuentra mayoritariamente en el sobrenadante, como se puede ver al comparar las calles 4 y 7, en las que se aplicó un 1.2% del sobrenadante y un 12% del sedimento, respectivamente. El sobrenadante, que contiene las proteínas solubles en presencia de KCl 300 mM, se dializó frente a tampón B (sin KCl). Tras la diálisis se observa la aparición de agregados proteicos insolubles. Este fenómeno de pérdida de solubilidad de proteínas por disminución de la fuerza iónica del tampón podía utilizarse para la purificación de RepB siempre que se produjera una alteración diferencial de la solubilidad de ésta con respecto al resto de las proteínas. Para saber si esto ocurría, se tomaron cuatro alícuotas de la fracción dializada (correspondiente a 0 mM de KCl), y tres de ellas se llevaron a concentraciones de KCl 25 mM, 50 mM y 100 mM, respectivamente. Las proteínas solubles (Fig. 44B, calles 2 a 5) e insolubles (calles 7 a 10) a cada una de estas concentraciones de sal se separaron por centrifugación y se analizaron mediante SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 44B, la eliminación de las proteínas disueltas a 0 mM de KCl (calle 5) o a 25 mM de KCl (calle 4) supone una gran purificación de RepB (calles 10 y 9) que puede realizarse, además, en un corto espacio de tiempo. El empleo de tampón de diálisis sin KCl hace que el proceso de precipitación de RepB por eliminación de la sal se pueda llevar a cabo en menos de 4 horas (diálisis frente a 2 l de tampón, 2 cambios) ya que, aunque no se alcance el equilibrio durante la diálisis, hay un gran margen de concentración de KCl en el que la proteína presenta muy baja solubilidad (prácticamente hasta 50 mM). La purificación de RepB se prosiguió, pues, del modo siguiente: las proteínas dializadas frente a tampón B (sin KCl) se sometieron a centrifugación, y el sedimento se disolvió en 20 ml de tampón B suplementado con KCl 300 mM y se aplicó a una columna de heparina-agarosa equilibrada con el mismo tampón. Las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron mediante un gradiente lineal de 300 mM a 600 mM de KCl (120 ml). El volumen

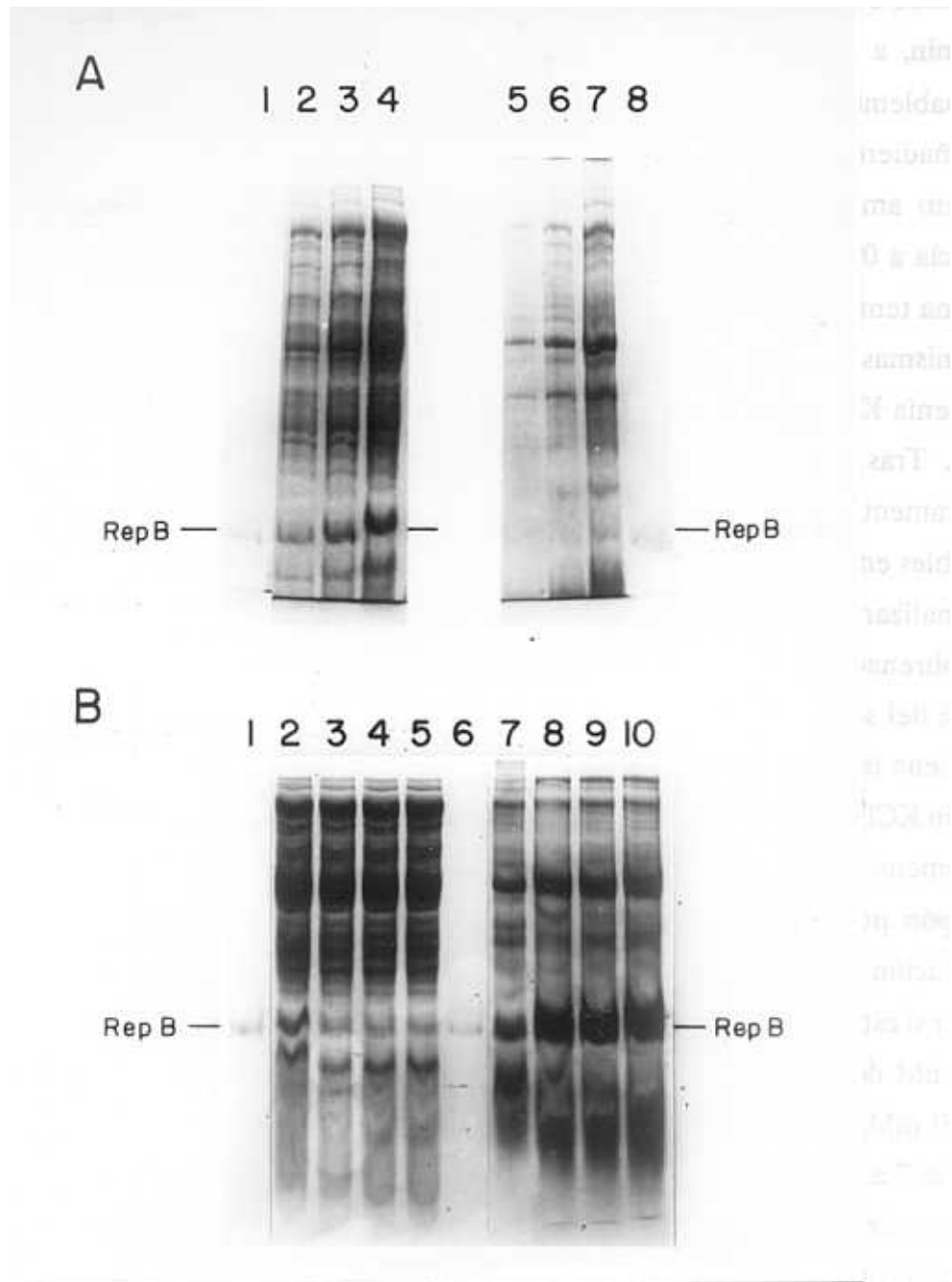


Figura 44. Purificación de RepB: precipitación selectiva en condiciones de baja fuerza iónica. A, la fracción proteica precipitada con sulfato amónico (70% de saturación) se llevó a 300 mM de KCl en tampón B. Las proteínas precipitadas y disueltas en estas condiciones se separaron por centrifugación, y fueron analizadas mediante SDS-PAGE (10% de PAA) y tinción con CBB. Calles 2 a 4: distintas cantidades del sobrenadante de la centrifugación (proteínas solubles); los porcentajes del volumen total de sobrenadante aplicados al gel fueron: 0.4% (calle 2), 0.8% (calle 3) y 1.2% (calle 4). Calles 5 a 7: distintas cantidades de sedimento (proteínas precipitadas); se aplicó el 3% (calle 5), 6% (calle 6) y 12% (calle 7) del sedimento total. Calles 1 y 8: 0.2 μ g de RepB pura. B, el sobrenadante obtenido en la centrifugación en presencia de 300 mM de KCl (calles 2 a 4 en panel A) se llevó a distintas concentraciones de sal, y las proteínas disueltas y precipitadas en cada una de estas condiciones se separaron por centrifugación y se analizaron mediante SDS-PAGE (15% de PAA) y tinción con CBB. En el gel se aplicó un 3% de los sobrenadantes (calles 2 a 5) y sedimentos (calles 7 a 10) correspondientes a 100 mM de KCl (calles 2 y 7), 50 mM de KCl (calles 3 y 8), 25 mM de KCl (calles 4 y 9), y 0 mM de KCl (calles 5 y 10). Calles 1 y 6: 0.2 μ g de RepB pura.

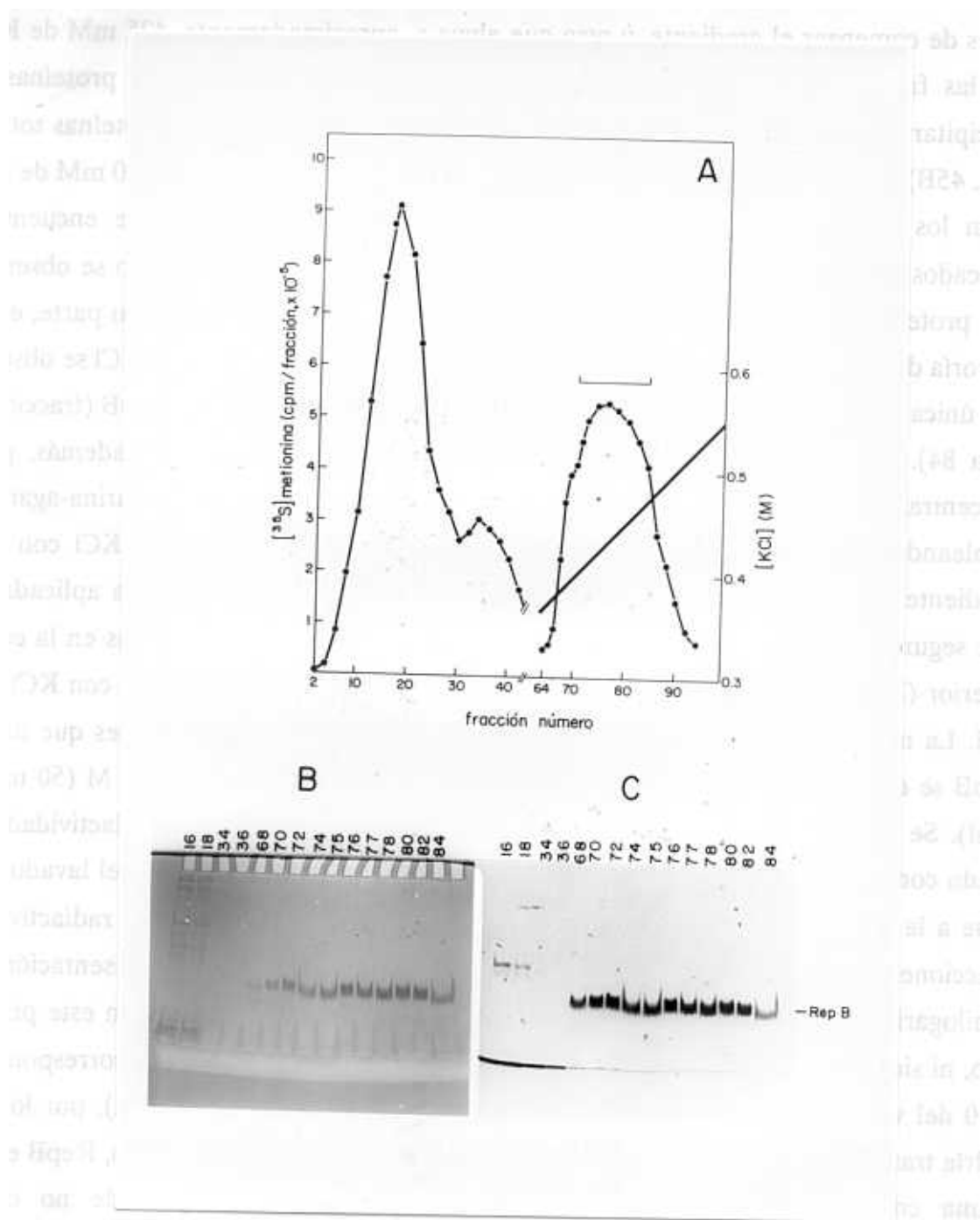


Figura 45. Purificación de RepB: fraccionamiento en heparina-agarosa (columna I). **A**, perfil cromatográfico mostrando la radiactividad de las fracciones (●) y la pendiente del gradiente de KCl aplicado. Las fracciones en los picos de radiactividad indicadas en **B** y **C** se analizaron por SDS-PAGE (12% de PAA). **B**, gel teñido con CBB, y **C**, fluorograma del mismo gel. Las fracciones indicadas en el panel **A** (barra horizontal) se juntaron y aplicaron a la siguiente columna.

recogido por cada fracción fue de 2 ml, y se determinó la radiactividad de las fracciones, contándose 30 μ l de las mismas. Los resultados (en cpm por fracción) se presentan en la Figura 45A, donde se observan dos picos mayoritarios de radiactividad: uno que eluye antes de comenzar el gradiente, y otro que eluye a, aproximadamente, 425 mM de KCl. De las fracciones en los picos se tomaron muestras de 100 μ l, cuyas proteínas se precipitaron con TCA y se sometieron a SDS-PAGE para detectar las proteínas totales (Fig. 45B) y las marcadas (Fig. 45C). Entre las proteínas no adsorbidas a 300 mM de KCl están los polipéptidos correspondientes a β -Lactamasa y RepA, que se encuentran marcados radiactivamente (fracciones 16, 18, 34 y 36 en Fig. 45B y C). No se observan más proteínas marcadas eluidas antes de la aplicación del gradiente. Por su parte, en la mayoría de las fracciones correspondientes al pico que eluye a 425 mM de KCl se observa una única proteína, que está marcada radiactivamente y corresponde a RepB (fracciones 68 a 84). Para realizar una última etapa de purificación que sirviera, además, para concentrar la proteína, se efectuó una nueva cromatografía en heparina-agarosa, empleando para la elución de RepB un gradiente de concentración de KCl con una pendiente mayor que la del gradiente de la columna anterior. La muestra aplicada en esta segunda columna se preparó juntando las fracciones 70 a 84 obtenidas en la etapa anterior (Fig. 45) y dializando la mezcla frente a tampón B suplementado con KCl 300 mM. La muestra (30 ml) se aplicó a la columna en las mismas condiciones que antes. RepB se eluyó haciendo pasar un gradiente lineal de KCl de 300 mM a 1 M (50 ml en total). Se recogieron fracciones de 2 ml, y se determinó el perfil de radiactividad del eluido contando 100 μ l de cada una de las fracciones (Fig. 46A). Durante el lavado que sigue a la aplicación de la muestra se observa la aparición de un pico de radiactividad (fracciones 4 a 30), negligible si se tiene en cuenta que la representación es semilogarítmica. No hemos podido detectar ninguna proteína asociada con este primer pico, ni siquiera cuando la cantidad de muestra sometida a electroforesis corresponde a 1/10 del volumen de la fracción de máxima radiactividad (no se muestra), por lo que podría tratarse de contaminantes en muy pequeña concentración. De nuevo, RepB eluyó a una concentración de KCl alrededor de 425 mM. Con objeto de no diluir innecesariamente la proteína, se juntaron sólo las fracciones 60 a 66 (ambas incluidas). Esta mezcla (14 ml) contiene más del 95% de la proteína RepB eluida entre las fracciones 55 y 74 (Fig. 46A), según se calculó a partir de los valores de radiactividad correspondientes a las distintas fracciones. En este estado, RepB parece electroforéticamente pura (Fig. 46B, calle 5). Con el fin de preparar la proteína pura para su conservación a -70°C, la muestra se dializó durante 12 horas frente a tampón B suplementado con KCl 425 mM, y conteniendo glicerol al 50%. Este tratamiento aumentó 3.5 veces la concentración de la proteína (Fig. 46B, calle 6), que tras esta etapa pasó a ser, aproximadamente, 0.2 μ g/ μ l, como se determinó por lectura densitométrica directa

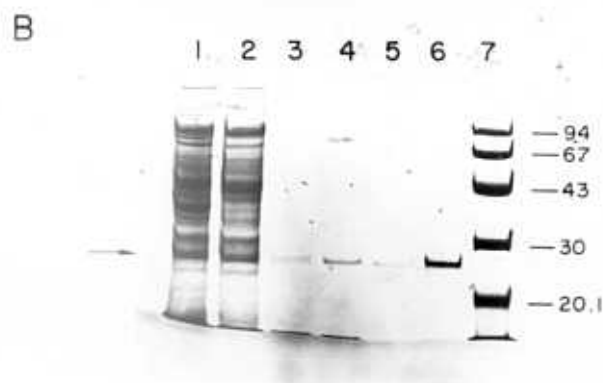
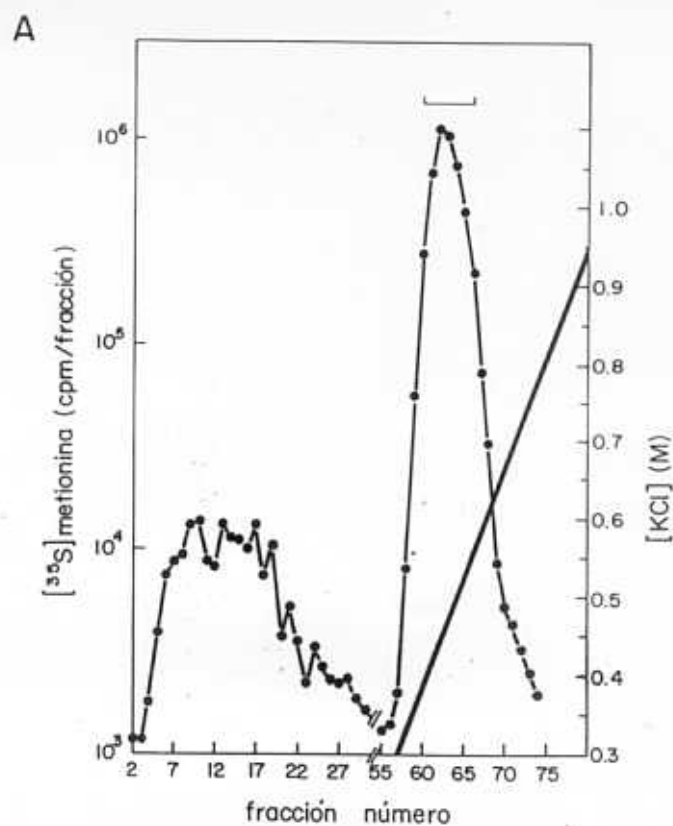


Figura 46. Purificación de RepB: fraccionamiento en heparina-agarosa (columna II). A, perfil cromatográfico mostrando la radiactividad de las fracciones (●; nótese que la representación es semilogarítmica) y la pendiente del gradiente de KCl aplicado. Las fracciones indicadas (barra horizontal) se juntaron y concentraron, considerándose como RepB pura. B, etapas de purificación de RepB analizadas por SDS-PAGE (12% PAA) y tinción con CBB. Se muestran las proteínas correspondientes a: 2 μ l del extracto crudo (calle 1); 2 μ l de la fracción precipitada con sulfato amónico (calle 2); 2 μ l (calle 3) y 4 μ l (calle 4) de la fracción precipitada a baja fuerza iónica; 4 μ l de RepB pura de la columna II de heparina-agarosa (calle 5); 4 μ l de RepB pura concentrada en glicerol (calle 6). Calle 7: proteínas estándar (las utilizadas en Figura 41), con los pesos moleculares (en kDa) indicados a la derecha. La flecha señala la posición de RepB.

TABLA 7: Purificación de RepB

Etapa de purificación	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Unidades totales	Actividad específica (u/mg)
Extracto crudo	30	200	-- ^a	--
Sulfato amónico	15	62	-- ^a	--
Bajada de sal	20	28	3800	136
Heparina-agarosa (I)	30	0.9	2100	2330
Heparina-agarosa (II), concentrada	4.1	0.81	2050	2530

(a) Valores no cuantificables por la presencia de actividades nucleolíticas en la muestra

de geles secos teñidos con CBB (no se muestra). El rendimiento final de RepB fue, por lo tanto, de unos 800 μ g de proteína pura obtenidos a partir de 2 l de cultivo.

Ya que RepB tiene actividad tipo topoisomerasa I específica del *ori*(+) de pLS1 (véase Fig. 48), hemos utilizado esta propiedad para valorar las diferentes etapas de su purificación (Tabla 7). Hemos definido una unidad de RepB como la cantidad de proteína requerida para convertir 1 μ g de DNA ccc superenrollado de pLS1 en la forma ccc relajada, a 37°C durante 30 min. Los ensayos de actividad enzimática de RepB se realizaron en las condiciones descritas más adelante, y la cuantificación se realizó por densitometrado de geles en los que se habían separado los productos de reacción (véase Fig. 48).

Determinación del extremo N-terminal de RepB pura e identificación del codón de iniciación de *repB*.

La determinación de la secuencia amino-terminal de RepB (Fig. 47) muestra que, excepto para el residuo Y8 (cuya identificación fue ambigua), los 9 primeros residuos coinciden con los aminoácidos predichos a partir de la secuencia de DNA, comenzando en el codón de iniciación ATG en la coordenada 853. Este ATG está precedido por un sitio atípico de unión a los ribosomas (a.r.b.s.), que ya ha sido mencionado. Es interesante

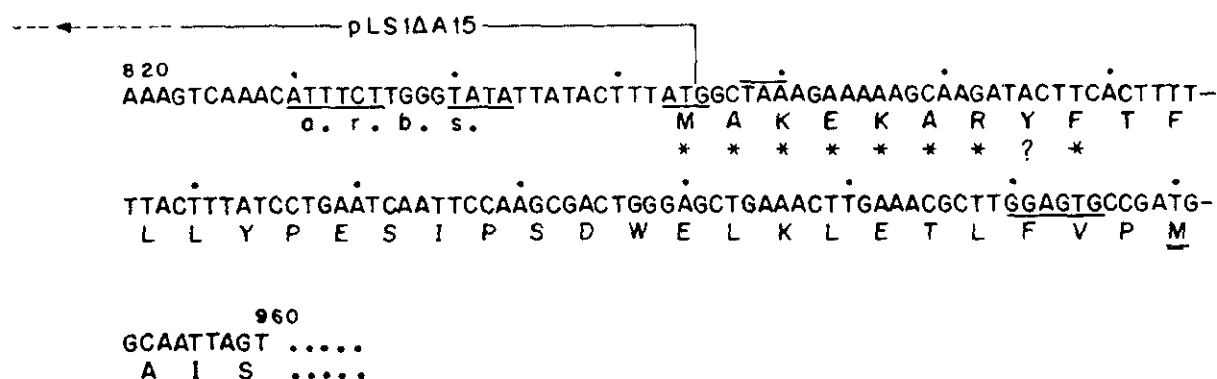


Figura 47. Determinación de la secuencia N-terminal de RepB. Se muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena codificante de pLS1 entre las coordenadas 820 y 960, y los residuos predichos para RepB a partir de esta secuencia. (*) indica coincidencia entre el residuo predicho y el determinado en el análisis de la proteína pura; (?) indica posible identidad. Se muestra también la secuencia correspondiente al a.r.b.s., el codón de iniciación de *repB* y el extremo derecho de la región delecionada en pLS1ΔA15. Una secuencia que podría funcionar como S.D. para la putativa RepB^{*} y la Met inicial de ésta aparecen subrayadas.

hacer notar que existe un segundo codón ATG en posición 949 (Fig. 47), precedido por una posible secuencia S.D. (GGAGTG, coordenada 940), que no parece ser usada en *E.coli*, ya que en este microorganismo sólo se detecta la proteína sintetizada a partir del primer ATG. Sin embargo, no podíamos descartar *a priori* que este segundo codón de iniciación de RepB fuera el empleado en *S.pneumoniae*, de forma que la utilización del primer codón ATG fuera un artefacto debido al sistema de expresión de *E.coli* utilizado. Para estudiar esta posibilidad, se construyeron una serie de derivados delecionados de pLS1 por digestión con BAL31 del DNA de este plásmido linealizado en el sitio único BglI(804). Después de transformar un cultivo competente de *S.pneumoniae* 708 con la mezcla de ligación procedente de estos experimentos, se aislaron varios de estos derivados, y los que parecían más interesantes fueron secuenciados. Uno de ellos, denominado pLS1ΔA15, muestra una deleción que incluye las coordenadas 760 a 854. Esta deleción elimina parte del gen *repA* (pero no el promotor P_{AB}) y los dos primeros nucleótidos del codón de iniciación de *repB* en 853 (Fig. 47). Además, la deleción sitúa un codón de terminación TAA (posición 858) en fase con la lectura del fragmento del gen *repA* presente en pLS1ΔA15, de forma que no podría sintetizarse una proteína de fusión RepA-RepB. En resumen, este derivado plasmídico sólo codificaría, si acaso, una variante de RepB (RepB') que comenzara en el segundo codón ATG. El clon del que se aisló pLS1ΔA15 presentaba, además, otro plásmido acompañante de tamaño similar al de pLS1 y que, según reveló un análisis de restricción, ha eliminado sólo unas pocas bases alrededor del sitio BglI. El plásmido pLS1ΔA15 sólo pudo ser establecido en células de

pneumococos cuando las funciones de replicación fueron suministradas en *trans* por pLS1. Los resultados anteriores indican que en *S.pneumoniae* RepB es traducida, también, desde el primer codón ATG. Si un polipéptido RepB* sintetizado a partir del segundo codón ATG, y similar a la proteína A* de ϕ X174, se sintetiza a partir de pLS1 (o de pLS1 Δ A15), no parece ser suficiente para la replicación *in vivo*, al igual que ocurre con la proteína A* (Colasanti y Denhart, 1987). Ya que la traducción de RepB parece usar la secuencia a.r.b.s. tanto en *E.coli* como en *S.pneumoniae* (y probablemente también en *B.subtilis*), el reconocimiento de esta secuencia por los ribosomas puede estar bastante extendido entre las bacterias. Curiosamente, entre los plásmidos de bacterias gram-positivas, los genes *rep* de la familia de pT181 muestran una secuencia S.D. (Projan y Novick, 1988), mientras que para los genes *rep* de pC194 y pE194 no se han encontrado ni secuencias S.D. ni a.r.b.s. (Horinouchi y Weisblum, 1982a, 1982b; Villafane y cols, 1987).

Análisis de la estructura secundaria de RepB no predijeron la existencia de motivos de unión a DNA de tipo α hélice-vuelta- α hélice (Ohlendorf y cols, 1983). A partir del residuo 77 de RepB se localiza una región con cuatro leucinas espaciadas entre sí por siete residuos, lo cual encaja en las características generales del motivo de cremalleras de Leu, presente también en otras proteínas iniciadoras de la replicación plasmídica (Giraldo, 1991).

Actividad enzimática de RepB.

Una vez purificada RepB, hemos probado su actividad sobre DNA ccc superenrollado. En este trabajo se describe únicamente la caracterización primaria de esta actividad, porque su estudio más detallado se ha publicado en otro sitio (de la Campa y cols, 1990). Las mezclas de reacción para los ensayos de actividad contenían, en un volumen final de 25 μ l, Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, KCl 100 mM, DTT 5 mM, EG 5%, MnCl₂ 20 mM, 0.5 μ g de DNA, y la cantidad de RepB indicada en cada caso. Después de la incubación a 37°C durante 30 min, se añadieron a cada muestra 6 μ g de proteinasa K, la cual se dejó actuar durante 10 min a temperatura ambiente. Tras añadir el colorante de carga, las muestras se corrieron (30 V, 16 h) en geles de agarosa al 1% en tampón TBE conteniendo 1 μ g/ml de EtBr. Los resultados de ensayos de actividad de RepB sobre el DNA ccc superenrollado (forma I) de pLS1, utilizando distintas cantidades de la proteína pura, se muestran en la Figura 48A (calles 4 a 8). Como se observa en esta Figura, los productos de reacción obtenidos consisten en formas OC (II)

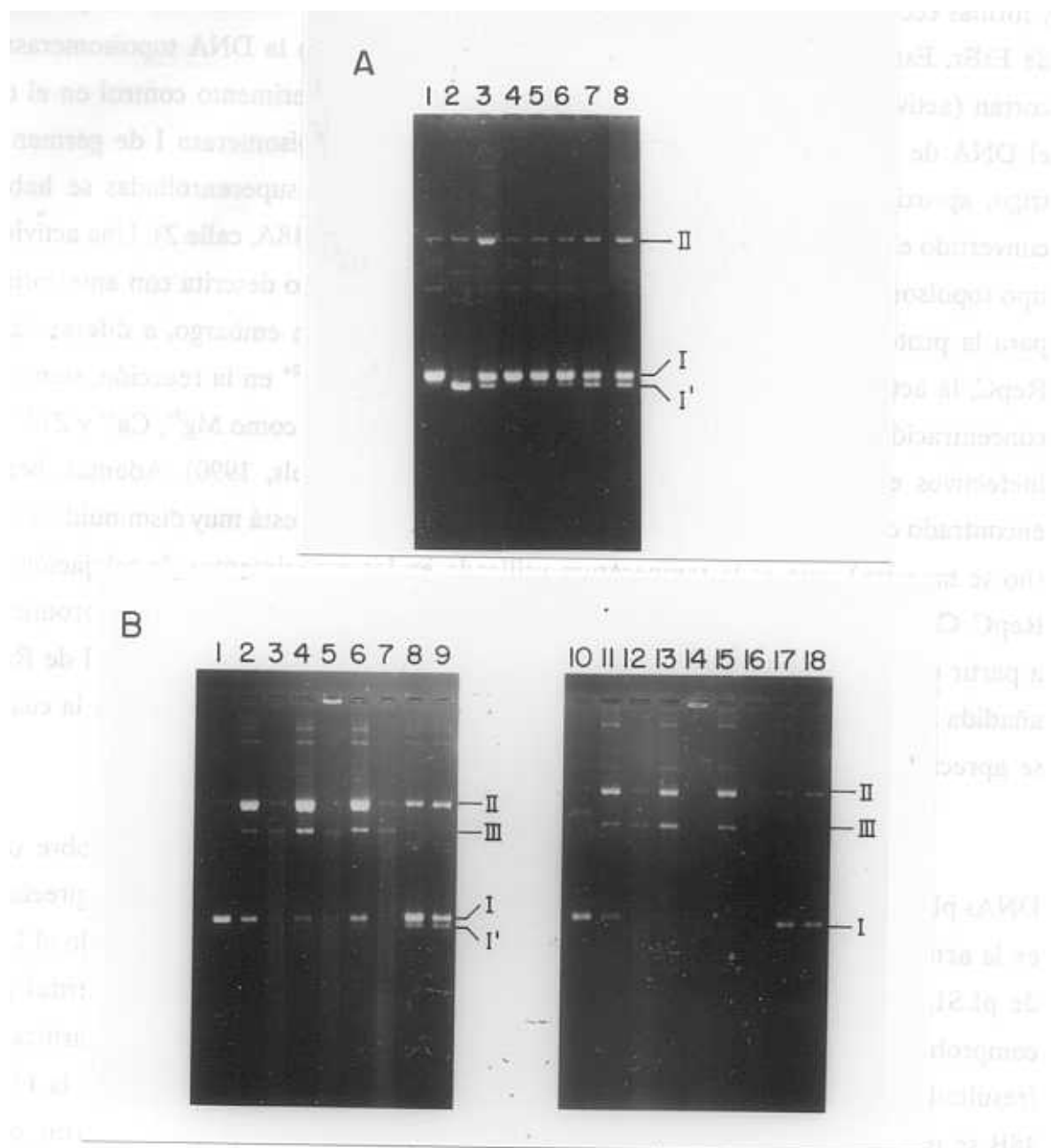


Figura 48. Actividad tipo topoisomerasa de RepB. **A**, acción de la proteína RepB pura sobre el DNA superenrollado de pLS1. Las mezclas de reacción (25 μ l, tratadas según se explica en el texto) contenían 0.5 μ g de DNA de pLS1 y la cantidad de RepB pura que se indica a continuación: 0 ng (calle 1); 2 ng (calle 4); 6 ng (calle 5); 20 ng (calle 6); 60 ng (calle 7); y 180 ng (calle 8); nótese que en esta muestra se rompe la proporcionalidad entre la cantidad de RepB añadida y la de formas I' obtenidas). En otra muestra (calle 3) se utilizó como fuente de RepB 60 ng de proteína total (2 μ l) de la mezcla de fracciones elegidas tras la primera cromatografía en heparina-agarosa (Fig. 45). Se incluye también un control (calle 2) en el que el DNA de pLS1 fue incubado con 8 u de topoisomerasa I. Se ha señalado la posición de las formas I, I' y II del DNA de pLS1. **B**, acción de RepB sobre los DNAs superenrollados de pLS1 Δ 24 y pT181, a lo largo de las etapas de purificación. Se prepararon mezclas de reacción que contenían 0.5 μ g de DNA de pLS1 Δ 24 (calles 1 a 9) o de pT181 (calles 10 a 18). Las mezclas se incubaron (37°C, 30 min) en ausencia de RepB (calles 1 y 10), o empleando como fuente de RepB las siguientes cantidades de proteínas totales correspondientes a las distintas etapas de purificación: 17 ng (2.5×10^{-3} μ l, calles 2 y 11) y 170 ng (2.5×10^{-2} μ l, calles 3 y 12) de extracto crudo; 100 ng (2.5×10^{-2} μ l, calles 4 y 13) y 1000 ng (2.5×10^{-1} μ l, calles 5 y 14) de la fracción precipitada con sulfato amónico; 350 ng (2.5×10^{-1} μ l, calles 6 y 15) y 3500 ng (2.5 μ l, calles 7 y 16) de la fracción precipitada a baja fuerza iónica; 30 ng (1 μ l, calles 8 y 17) y 60 ng (2 μ l, calles 9 y 18) de la mezcla de fracciones procedentes de la columna de heparina-agarosa I. Se señalan las posiciones de las formas I, II y III de los DNAs de pLS1 Δ 24 y pT181, y I' del DNA de pLS1 Δ 24.

y formas ccc relajadas (I'), que se separan entre sí durante la electroforesis en presencia de EtBr. Esta acción es característica de enzimas que, como la DNA topoisomerasa I, cortan (actividad "nicking") y sellan el DNA. Así, en un experimento control en el que el DNA de pLS1 fue incubado en presencia de 8 u de topoisomerasa I de germen de trigo, aproximadamente el 90% de las formas plasmídicas superenrolladas se habían convertido en formas I', en 30 min de incubación a 37°C (Fig. 48A, calle 2). Una actividad tipo topoisomerasa similar a la encontrada para RepB ha sido descrita con anterioridad para la proteína RepC de pT181 (Koepsel y cols, 1985). Sin embargo, a diferencia de RepC, la actividad de RepB depende de la presencia de Mn^{2+} en la reacción, siendo su concentración óptima 20 mM. Otros cationes divalentes tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} son inefectivos en las condiciones probadas (de la Campa y cols, 1990). Además, hemos encontrado que, en este tipo de ensayos, la actividad de RepB está muy disminuida a 32°C (no se muestra), que es la temperatura utilizada en los experimentos de relajación con RepC. Como se observa en la Figura 48A, la cantidad de formas ccc relajadas producidas a partir del DNA superenrollado aumenta proporcionalmente con la cantidad de RepB añadida al ensayo, hasta una concentración 100 nM de la proteína, a partir de la cual no se aprecia aumento del producto relajado (calles 4 a 8).

La acción tipo topoisomerasa de RepB se ha probado también sobre otros DNAs plasmídicos derivados de pLS1, sin que se hayan observado diferencias apreciables en la actividad de la proteína sobre los distintos sustratos. Así, hemos empleado el DNA de pLS1 Δ 24 (cuya delección es la que más se acerca al *ori*(+) por la izquierda) para comprobar la actividad de RepB a lo largo de las distintas etapas de purificación (resultados similares, no mostrados, se obtuvieron con el DNA de pLS1). En la Figura 48B se muestran los productos de ensayos de relajación en los que se utilizaron, como fuente de RepB: el extracto crudo de células de BL21(DE3)/pLS19 tras la precipitación de los ácidos nucleicos (calles 2 y 3), la fracción de proteínas precipitadas con sulfato amónico (70% de saturación) (calles 4 y 5), las que precipitaron en ausencia de KCl (calles 6 y 7), y la proteína obtenida tras la primera columna de heparina-agarosa (calles 8 y 9). La proteína RepB obtenida de la segunda cromatografía en heparina-agarosa (concentrada en glicerol) es la que se empleó en los ensayos presentados en la Figura 48A, y que acabamos de ver. Ni en el extracto crudo, ni tras el fraccionamiento con sulfato amónico, hemos podido detectar actividad de RepB, debido a la degradación del DNA por nucleasas. En ambos casos se observa, a la menor concentración de proteínas en el ensayo, la conversión de las formas plasmídicas superenrolladas (I) en formas OC (II) y lineales (III) (Fig. 48B, calles 2 y 4). Esta actividad no es, sin embargo, específica del DNA de pLS1, ya que los mismos productos (OC y lineales) se obtienen también por

incubación del DNA de pT181 con dichas fracciones proteicas (Fig. 48B, calles 11 y 13). A una mayor concentración de las proteínas presentes en el extracto crudo y en la fracción precipitada con sulfato amónico, se observa la degradación casi total de los DNAs de pLS1Δ24 y pT181 (calles 3, 5 y 12, 14, respectivamente). En la fracción de proteínas precipitadas en ausencia de KCl (calles 6, 7 y 15, 16) se observa, a la concentración más baja, cierta actividad tipo topoisomerasa que sólo tiene lugar sobre el DNA del replicón pLS1 (calle 6), en tanto que continúa observándose la aparición inespecífica de formas OC y lineales (calles 6 y 15). De nuevo, a mayores concentraciones proteicas se produce la degradación de uno y otro DNA (calles 7 y 16, respectivamente). Cuando se utiliza la proteína RepB obtenida tras la primera cromatografía en heparina-agarosa, se observa claramente la aparición de la forma I' (actividad RepB) a partir del DNA superenrollado de pLS1Δ24 (calles 8 y 9). Esta actividad no se observa, sin embargo, cuando se utiliza como sustrato DNA de pT181 (calles 17 y 18). En este caso sólo se produce un ligero aumento de las formas OC, probablemente debido a la existencia de una nucleasa contaminante, ya que dicho aumento no se observa cuando se utiliza la proteína purificada mediante una segunda cromatografía en heparina-agarosa (no se muestra). La misma actividad contaminante se detecta al usar como sustrato DNA del replicón pLS1 (compárense las calles 3 y 7 de la Fig. 48A). Tampoco se ha observado actividad topoisomerasa de RepB pura sobre los DNAs de los plásmidos pKN182 y pBR322 de *E.coli*, ni sobre el de los plásmidos de estafilococos pC194 y pE194, a pesar de que este último presenta una gran homología con pLS1 en la región del *ori*(+) (véase en Discusión).

De todos los experimentos anteriores se desprende que RepB tiene actividades tanto endonucleasa de cadena sencilla como selladora, específicas del DNA de pLS1. Ambas actividades serían esperadas para una proteína iniciadora de la replicación vía círculo rodante.

6. REGULACION TRANSCRIPCIONAL DE *repB*: LA PROTEINA RepA.

La primera evidencia experimental de la implicación de *repA* en la regulación de la replicación de pLS1 vino del estudio de la mutación *cop7*. Dicha mutación apareció en un derivado de pJS37, cuando células de pneumococos conteniendo este híbrido fueron sometidas a una fuerte presión selectiva para Cm^r (10 µg/ml). Enseguida se hizo evidente que el derivado delecionado que se seleccionó en estas condiciones (pJS3*cop7*) presentaba

un número de copias unas 5 veces más alto que pLS1, en cuyo replicón está basado pJS3*cop7* (Fig. 35). Con el fin de localizar de forma aproximada la mutación *cop7*, intercambiamos los fragmentos PstI A y B entre los plásmidos pLS5 y pJS3*cop7* (Fig. 49). El fragmento pequeño (B) de ambos plásmidos está constituido, exclusivamente, por DNA de pLS1 y es el que contiene el *ori*(+) de replicación. Este fragmento está afectado, en pLS5, por la delección de 332 pb que confiere doble número de copias plasmídico. En el fragmento PstI A de pLS5 y pJS3*cop7* se encuentran, respectivamente, los marcadores de resistencia a Tc y Cm (Fig. 49). Las mezclas de ligación se usaron para transformar un cultivo competente de *S.pneumoniae* 708. Las características diferenciales de cada uno de los fragmentos A y B permiten la fácil selección e identificación de las dos nuevas construcciones formadas por unión de un fragmento A y otro B, aún cuando cada uno de ellos se encuentre contaminado por su fragmento complementario. La construcción formada por combinación de los fragmentos PstI A de pLS5 y PstI B de pJS3*cop7*, presenta el mismo tamaño que pLS1 pero un número de copias 5 veces mayor, como corresponde a la mutación *cop7*. Esta construcción, denominada pLS1*cop7*, muestra un mapa de restricción exactamente igual al de pLS1 para todos los enzimas probados, de

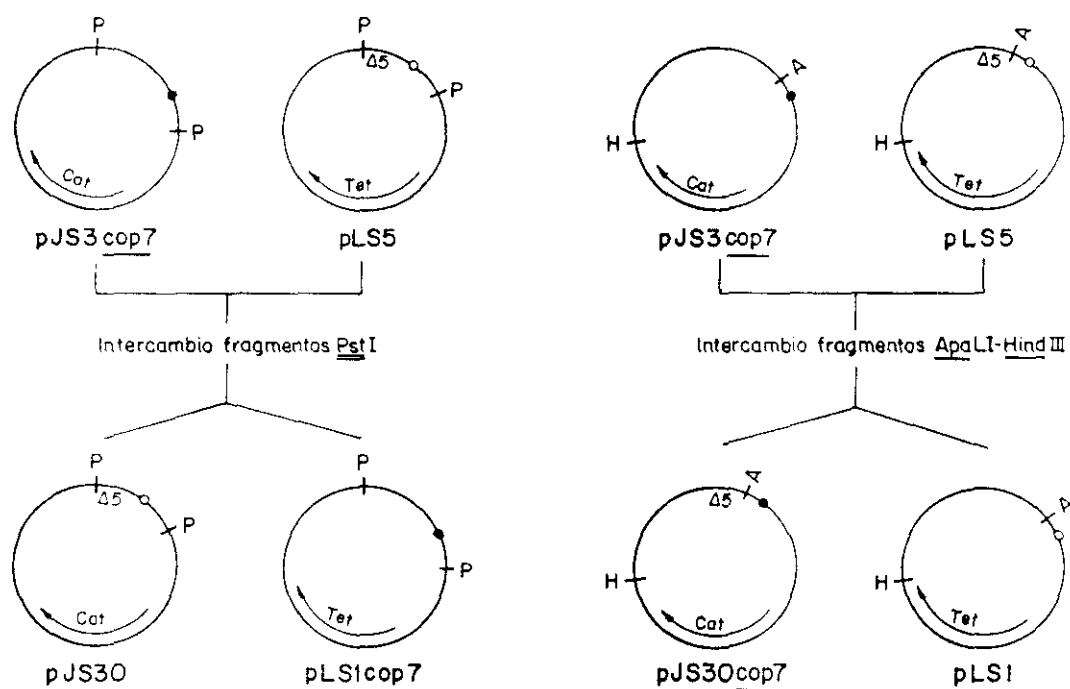


Figura 49. Localización primaria de la mutación *cop7* por intercambio de fragmentos. Se muestran los plásmidos utilizados y los fragmentos intercambiados en los dos experimentos que se llevaron a cabo. Sitios de restricción: A, ApaLI; H, HindIII; P, PstI. (Δ5) indica la región delecionada en pLS5. (●) señala la localización de la mutación *cop7*, delimitada en estos ensayos y precisada más tarde por secuenciación del DNA mutante. (○) corresponde al genotipo silvestre.

forma que si la alteración génica se debía a inserción o delección, éstas tenían que ser de muy pequeño tamaño. Por su parte, el plásmido pJS30, resultante de la unión de los fragmentos PstI A de pJS3*cop7* y PstI B de pLS5, es de menor tamaño que pJS3 y su número de copias es doble que el de pLS1, como se espera para un plásmido con la delección característica de pLS5. De estos resultados se desprende que la mutación *cop7* mapea en el fragmento PstI B (Fig. 49). Para definir mejor la localización de la mutación, de manera que la secuenciación posterior resultara más sencilla, analizamos las consecuencias de un intercambio de fragmentos HindIII-ApaLI entre pJS3*cop7* y pLS5. De nuevo, el fragmento pequeño HindIII-ApaLI de ambos plásmidos está constituido sólo por DNA de pLS1 y se encuentra afectado por la delección de 332 pb de pLS5, en tanto que el fragmento grande HindIII-ApaLI contiene el marcador de resistencia correspondiente a uno y otro plásmido (Fig. 49). La nueva construcción formada por la combinación del fragmento grande de pLS5 y el pequeño de pJS3*cop7* es, en tamaño y número de copias, idéntica a pLS1. Esto indica que la mutación se encuentra en el fragmento HindIII-ApaLI grande de pJS3*cop7*. Efectivamente, el plásmido resultante del cambio de fragmentos recíproco, denominado pJS30*cop7*, presenta el mismo tamaño que pJS30 y un número de copias 10 veces mayor que el de pLS1, sugiriendo un efecto fenotípico aditivo de delección y mutación de copias. Estos resultados permiten localizar la mutación *cop7* en el fragmento de 449 pb comprendido entre los sitios ApaLI en posición 607 y PstI en posición 1056 (coordenadas sobre la secuencia de pLS1; Fig. 49). La determinación de la secuencia de DNA de pLS1*cop7* en esta región demostró que la mutación consiste, únicamente, en la transversión C → A en la coordenada 743, dentro del gen *repA* (Fig. 6).

La localización de una mutación de alto número de copias en *repA*, junto con el hecho de que este gen y *repB* constituyen una unidad transcripcional, sugieren que el producto génico de *repA* está implicado en la replicación o regulación de ésta en pLS1.

Síntesis e identificación de RepA en minicélulas de *B.subtilis* y en el sistema de expresión de *E.coli*.

Las proteínas especificadas por pLS1 fueron analizadas en minicélulas de *B.subtilis* CU403 por marcaje con [³⁵S]-metionina, [³H]-valina o [³H]-lisina, seguido por SDS-PAGE y fluorografía de los geles. Este sistema es útil para detectar la expresión de genes bajo sus propias señales de control. Los resultados muestran que un producto del tamaño esperado para RepA es sintetizado en *B.subtilis* a partir de pLS1, bajo sus propias

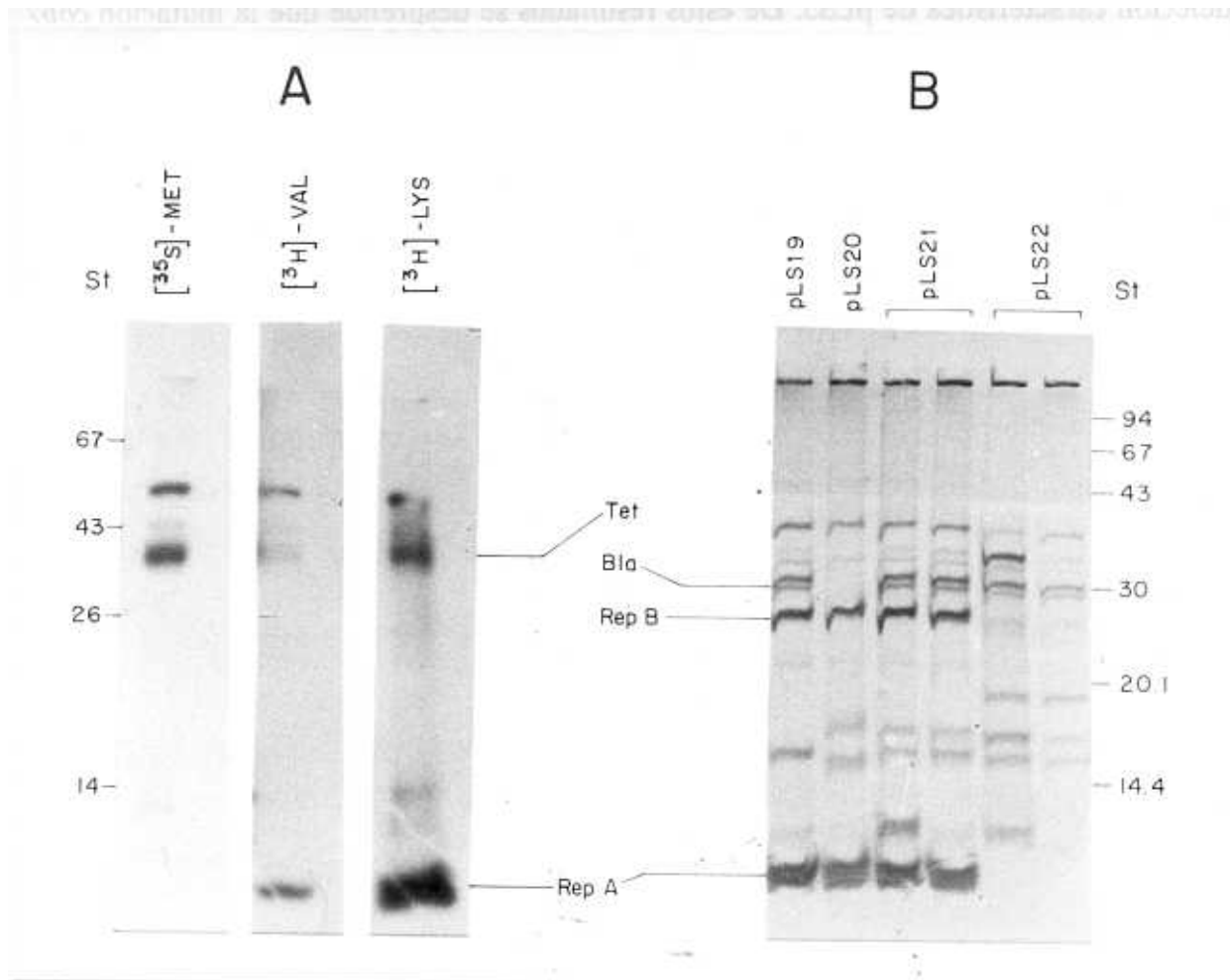


Figura 50. Expresión de *repA*. **A**, expresión de *repA* bajo el control de sus propias señales de transcripción/traducción, en minicélulas de *B.subtilis*. Las proteínas codificadas por pLS1 se marcaron con uno de los aminoácidos indicados y, tras la lisis celular, se detectaron por SDS-PAGE (5 al 25% de PAA) y fluorografía. Las cantidades aplicadas en el gel correspondían, aproximadamente, a 8 μ g de proteína celular total. A la derecha se señalan las bandas correspondientes a los productos Tet y RepA (nótese que Tet presenta una M_r menor que la esperada por su tamaño y que RepB no se detecta en este sistema). La posición y peso molecular (en kDa) de proteínas estándar (St) no marcadas radiactivamente (albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, α -quimotripsinógeno y lisozima) se indican a la izquierda. **B**, expresión de *repA* en *E.coli* bajo el control del promotor $\phi 10$ del fago T7. Cultivos de la estirpe BL21(DE3) conteniendo los plásmidos indicados se crecieron hasta DO 0.4, induciéndose el sistema por adición simultánea de IPTG y Rif, e incubación durante 60 min (pLS21, pocillo izquierdo) o 180 min (pLS19, pLS20, pLS21 pocillo derecho y pLS22 pocillo derecho). Para pLS22 se probó también un tratamiento con IPTG durante 7 min, seguido de la adición de Rif e incubación durante 60 min más (pocillo izquierdo). Tras el pulso con [³⁵S]-metionina y la lisis celular, las proteínas marcadas fueron analizadas por SDS-PAGE (10 al 20% de PAA) y autorradiografía. En la parte izquierda del autorradiograma se señalan las bandas correspondientes a algunos de los productos identificados. En la parte derecha se indica la posición y peso molecular (en kDa) de las proteínas estándar (St) no marcadas (las utilizadas en la Figura 41).

señales de transcripción y traducción (Fig. 50A). Como se observa, la máxima detección de RepA corresponde a la muestra marcada con [^3H]-lisina, de acuerdo con el alto contenido de la proteína en este aminoácido (16%). Además, sólo cuando se usaron aminoácidos tritiados se pudo detectar la síntesis de RepA, a pesar de que el contenido de la proteína en residuos Val (4%) es menor que el contenido en Met (9%). Tal diferencia podría deberse a que la intensificación obtenida mediante detección fluorográfica es, al menos, 70 veces mayor para el ^3H que para el ^{35}S . Utilizando este sistema también se puede detectar el producto del gen *tet* que, a pesar de tener unos 50000 Da, migra con una M_r de 38000, debido quizás a su composición altamente hidrofóbica (Lacks y cols, 1986). En minicélulas de *B.subtilis* no hemos detectado, sin embargo, ninguna banda que se pueda asignar a RepB, a pesar de que esta proteína presenta 18 residuos Lys y 14 residuos Val más que RepA. Esto indicaría que, aunque *repA* y *repB* se encuentran bajo el mismo promotor, la expresión génica final de *repB* está muy disminuida con respecto a la de *repA* y esta expresión diferencial podría deberse a la existencia de controles postranscripcionales, como distinta eficiencia de traducción de ambos genes o inhibición de la síntesis de RepB por el RNA II.

Para la hiperproducción de RepA hemos utilizado el sistema de expresión de *E.coli* basado en la combinación huésped BL21(DE3)/vector pET5. La identificación de RepA se consiguió por comparación de las proteínas que, tras la inducción con IPTG y el tratamiento con Rif, son sintetizadas en sistemas en los que *repA* se encuentra, o no, bajo el control del promotor $\phi 10$ de T7. Como ya hemos visto, las proteínas de nueva síntesis se visualizan mediante un breve marcaje con [^{35}S]-metionina, seguido de SDS-PAGE y fluorografía. Los mapas de las construcciones basadas en el vector pET5 y utilizadas en este estudio se presentaron en la Figura 40. En los sistemas con los plásmidos pLS21, pLS20 y pLS19, se sintetiza un polipéptido del tamaño esperado para RepA (Fig. 50B; y Fig. 51, calles 2, 3 y 5 a 7). Este polipéptido no se observa en los sistemas que llevan los plásmidos pLS22 o pET5 (Fig. 50B; y Fig. 51, calles 1, 4 y 8 a 10). Asimismo hemos comprobado (datos no mostrados) que la proteína es sintetizada en el sistema con pLS18, en el que *repA* se encuentra (al igual que en pLS21, pLS20 y pLS19) bajo el control del promotor $\phi 10$, mientras que no se observa en el sistema con pLS02, que presenta una reorientación del DNA correspondiente a pLS5 con respecto a dicho promotor (Fig. 40). Aunque en minicélulas de *B.subtilis* habíamos visualizado el producto del gen *tet* de pLS1 (Fig. 50A), esta proteína no ha sido observada en el sistema de expresión de *E.coli*, ni siquiera en el caso de pLS22, en el que el promotor $\phi 10$ se ha acercado al gen *tet* (Fig. 51, calles 8 a 10).

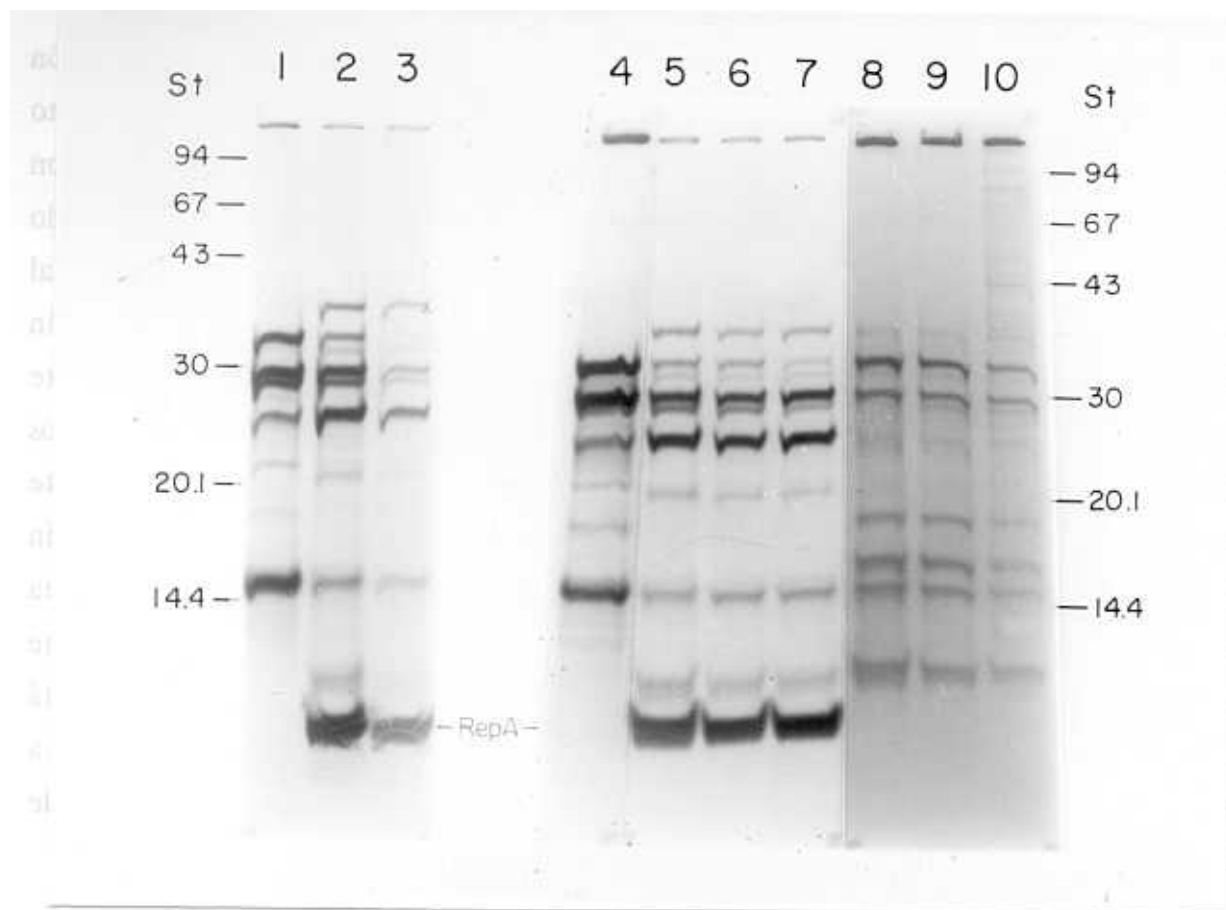


Figura 51. Optimización de la expresión de *repA* en el sistema con pLS19. Cultivos de *E.coli* BL21(DE3) conteniendo pLS19 fueron crecidos hasta DO 0.3 (calle 5), 0.4 (calles 2, 3 y 6), o 0.5 (calle 7). El pulso de marcaje se realizó tras la inducción del sistema por uno de estos tratamientos: adición simultánea de IPTG y Rif e incubación durante 180 min (calle 3); incubación con IPTG durante 7 min, adición de Rif e incubación durante 60 (calles 5 a 7) o 180 (calle 2) min más. Para la identificación inequívoca de RepA se incluyeron, como controles, muestras de cultivos con pET5 (crecidos a DO 0.4; calles 1 y 4) o con pLS22 (crecidos hasta DO 0.3, calle 8; 0.4, calle 9; o 0.5, calle 10). Las condiciones de inducción para los cultivos con pET5 fueron: tratamiento simultáneo con IPTG y Rif e incubación durante 180 min (calle 1), o tratamiento con IPTG durante 7 min, adición de Rif e incubación durante 60 min más (calle 4). Este último tratamiento fue el aplicado a los cultivos con pLS22 (calles 8 a 10). Las proteínas de nueva síntesis se detectaron mediante SDS-PAGE (10 a 20% de PAA) y autorradiografía. Las muestras correspondientes a pLS22 (calles 8 a 10) se sometieron a una exposición autorradiográfica cuatro veces más larga que el resto de las muestras. St: posición y peso molecular (kDa) de las proteínas estándar no marcadas (véase Figura 41).

La elección del plásmido y de las condiciones de inducción adecuadas es importante para conseguir un alto rendimiento de RepA, tal y como vimos que ocurría para la proteína RepB. Tres horas después de la adición simultánea de IPTG y Rif (Fig. 50B), la mayor tasa de síntesis *de novo* de RepA se observa en los sistemas que contienen pLS19 (el más eficiente) o pLS21. En comparación con éstos, la expresión de *repA* en el sistema con pLS20 está algo disminuida. No hay diferencias sustanciales entre la tasa de síntesis de la proteína una o tres horas después de la adición simultánea de inductor y antibiótico, ni para pLS21 (Fig. 50B), ni para el sistema con pLS19 (no se muestra). La adición simultánea de IPTG y Rif, constituye la condición óptima para la hiperexpresión génica a partir de los sistemas con pLS21, pLS20 o pLS18. La optimización

del sistema con pLS19 requiere, sin embargo, tiempos más largos de inducción, antes de la adición de Rif. Un tratamiento de 7 min con IPTG, previo a la adición del antibiótico, basta para conseguir una elevada tasa de síntesis de RepA, como se muestra en la Figura 51, donde se compara la síntesis *de novo* de RepA tras tres horas de tratamiento, en estas condiciones y en condiciones de adición simultánea de inductor y Rif (calles 2 y 3, respectivamente). Finalmente, hemos ensayado la inducción de cultivos de BL21(DE3)/pLS19 a tres DO distintas (0.3, 0.4 y 0.5) (Fig. 51, calles 5 a 7). A la vista de los resultados de estos experimentos, se escogió la DO de 0.4, que permite una elevada eficiencia de síntesis de la proteína, evitando el sobrecrecimiento de los cultivos y los riesgos que ello implica.

En resumen, para sobreproducir RepA en el sistema de expresión de *E.coli* se eligieron las siguientes condiciones: crecimiento de cultivos conteniendo pLS19 hasta una DO de 0.4, inducción con IPTG durante 7 min seguida por adición de Rif e incubación de los cultivos durante 3 h más. Este tratamiento tan largo permite una mayor acumulación de la proteína, aumentando el rendimiento total, sin que hayamos observado pérdida de la actividad biológica de la proteína purificada.

Purificación de RepA.

La purificación de RepA se realizó a partir de un litro de cultivo de *E.coli* BL21(DE3)/pLS19 tratado como acabamos de describir. Las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas con 100 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, EG 5%, EDTA 1 mM, DTT 1 mM), y suspendidas en 10 ml del mismo tampón. La pasta celular se pasó dos veces a través de una prensa French enfriada a 4°C, a una presión de 138 MPa. El lisado se centrifugó a 12000 xg durante 20 min. El sobrenadante se repartió en alícuotas de 2.5 ml, que fueron conservadas a -70°C hasta su utilización. Cada una de estas alícuotas de extracto crudo se mezcló con 500 µl de extracto marcado con [³⁵S]-metionina (unas 12000 cpm/µl), y se aplicó a una columna de agarosa. En las fracciones colectadas (2 ml) se determinó la radiactividad y concentración de proteínas. El perfil cromatográfico obtenido para estos dos parámetros se presenta en la Figura 52A. Existe un último pico de radiactividad, no representado, con una marca similar a la del pico centrado en la fracción 96, y desplazado 20 fracciones con respecto a éste. Dicho pico corresponde a la [³⁵S]-metionina libre, y no hemos detectado ninguna proteína asociada a él. La presencia de RepA se analizó mediante SDS-PAGE de las fracciones de los picos de radiactividad, seguida de tinción con CBB y fluorografía. De esta forma

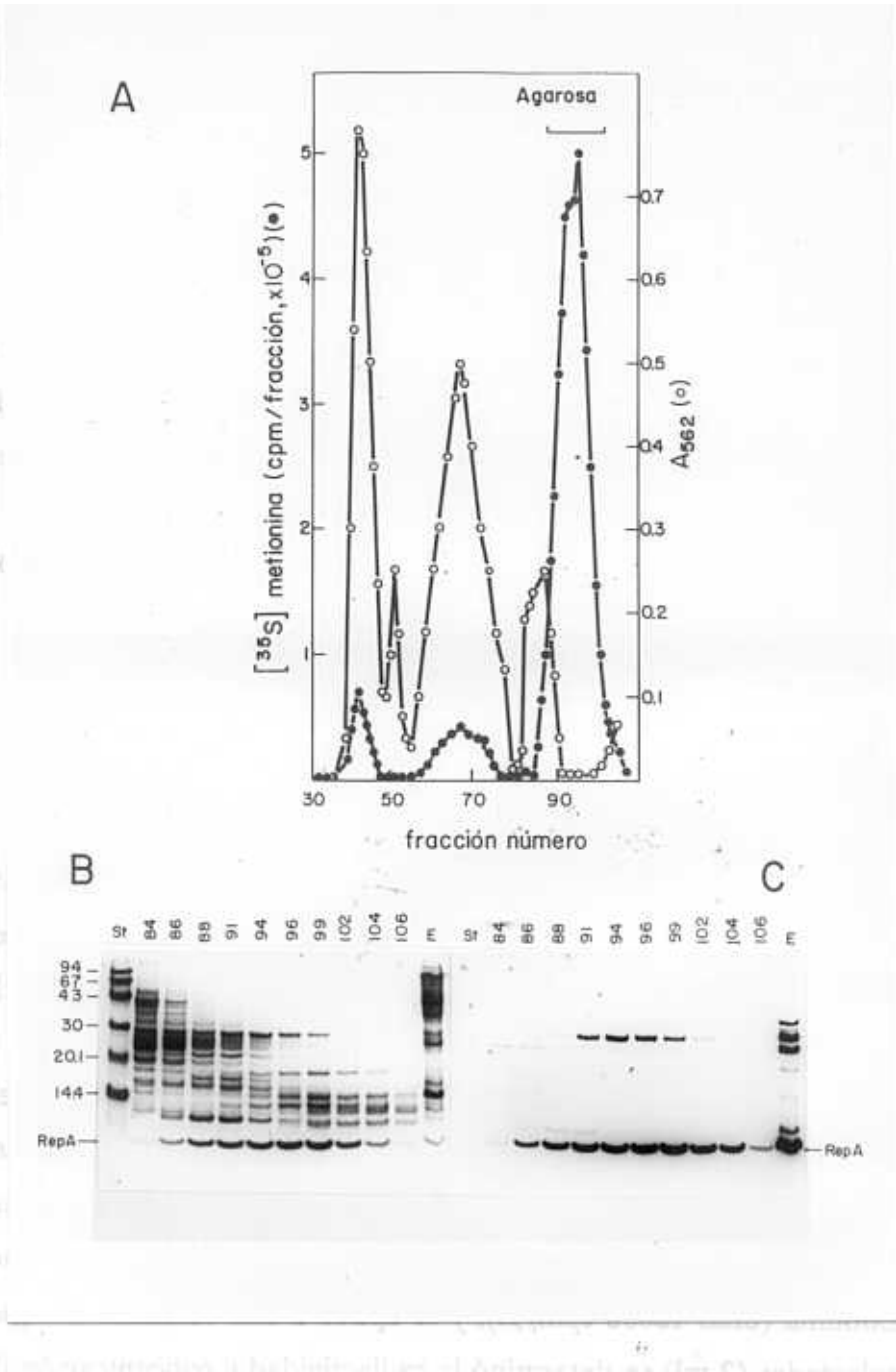


Figura 52. Purificación de RepA: fraccionamiento en columna de agarosa. **A**, perfil cromatográfico mostrando la radiactividad (●) y concentración de proteínas (○; determinada mediante el reactivo BCA; $A_{562} = 0.3$ corresponde a 0.2 mg/ml de proteína en la fracción). Una porción (15 μ l) de las fracciones en el pico de radiactividad se analizó por SDS-PAGE (17% de PAA). **B**, gel teñido con CBB, y **C**, fluorograma del gel. Los números encima de los pocillos indican la fracción analizada. Se incluye una muestra del extracto crudo (E) con proteínas de nueva síntesis marcadas radiactivamente. La posición de RepA está indicada. St: mezcla de proteínas estándar no marcadas (véase Figura 41), cuyos pesos moleculares (en kDa) se indican a la izquierda. Las fracciones indicadas en el panel A (barra horizontal) se juntaron y aplicaron a la siguiente columna.

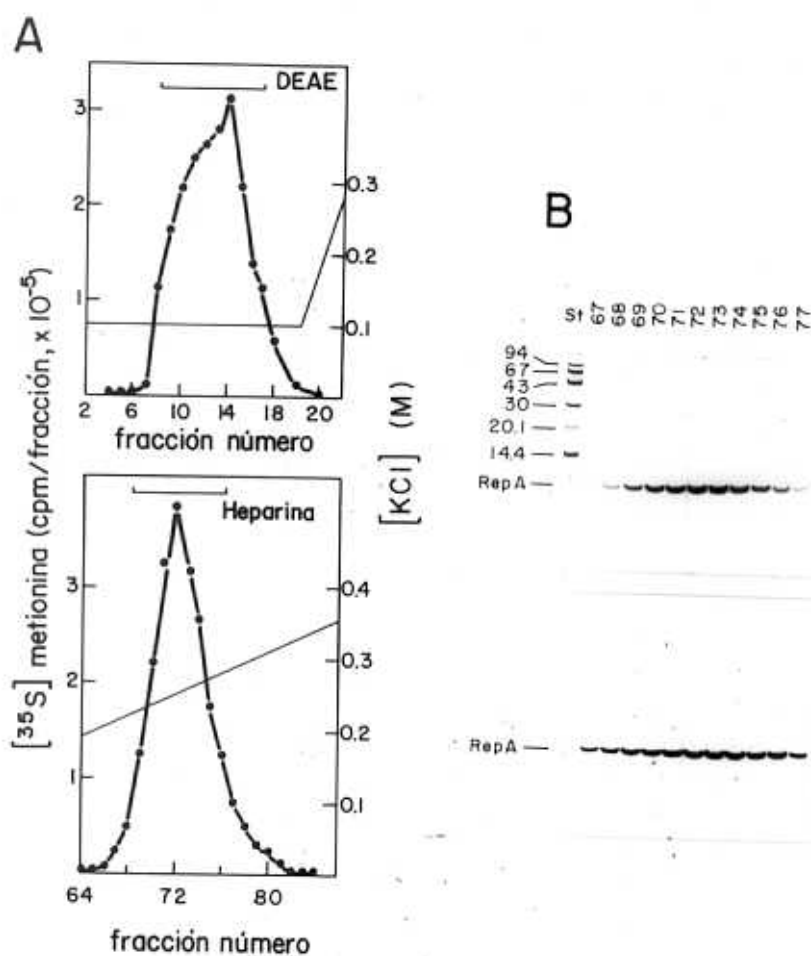


Figura 53. Purificación de RepA: fraccionamiento en DEAE-Sephacel y heparina-agarosa. **A**, perfiles cromatográficos mostrando la radiactividad de las fracciones (●) y la pendiente del gradiente de KCl aplicado. Se indican (barras horizontales) las fracciones de DEAE-Sephacel que se juntaron y aplicaron en la columna de heparina-agarosa, así como las fracciones procedentes de ésta que se mezclaron y consideraron como RepA pura. **B**, muestras (24 μ l) de las fracciones en el pico de radiactividad de la columna de heparina-agarosa se analizaron mediante SDS-PAGE (17% PAA), seguida de tinción con CBB (parte superior) y fluorografía (parte inferior). Los números encima de los pocillos indican la fracción analizada. La posición de RepA se indica en gel y fluorograma. St: mezcla de proteínas estándar no marcadas (véase Figura 41), cuyos pesos moleculares (kDa) se indican a la izquierda.

hemos podido comprobar que RepA eluye alrededor de la fracción 96, y que el pico de radiactividad asociado a estas fracciones corresponde tanto a RepA como a la β -Lactamasa (Fig. 52B y C). Las fracciones que contienen RepA presentan un contenido proteico mínimo, de forma que en esta primera etapa se obtiene un alto grado de purificación de la proteína (Fig. 52). Las fracciones 88 a 102 (señaladas en la Fig. 52A) se juntaron y se dializaron frente a tampón B suplementado con KCl 100 mM. La muestra (30 ml) se aplicó a una columna de DEAE-Sephacel, que se lavó con el mismo tampón, recogiendo fracciones de 4 ml. RepA y β -Lactamasa no se unen a la matriz a esta concentración de sal, en tanto que otras proteínas quedan adsorbidas en estas condiciones. Las fracciones 8 a 17 (indicadas en la Fig. 53A) se juntaron (40 ml) y se aplicaron a una columna de heparina-agarosa equilibrada con tampón B suplementado con KCl 100 mM. Las proteínas adsorbidas se eluyeron mediante la aplicación de un gradiente lineal de 100 a 500 mM de KCl (100 ml en total), recogiendo fracciones de 0.56 ml. RepA eluye a, aproximadamente, 250 mM de KCl. La β -Lactamasa no se une a la matriz de heparina a 100 mM de KCl, y es eluida antes del comienzo del gradiente. RepA parecía estar pura en las fracciones 68 a 76, a juzgar por los resultados de tinción para proteínas y

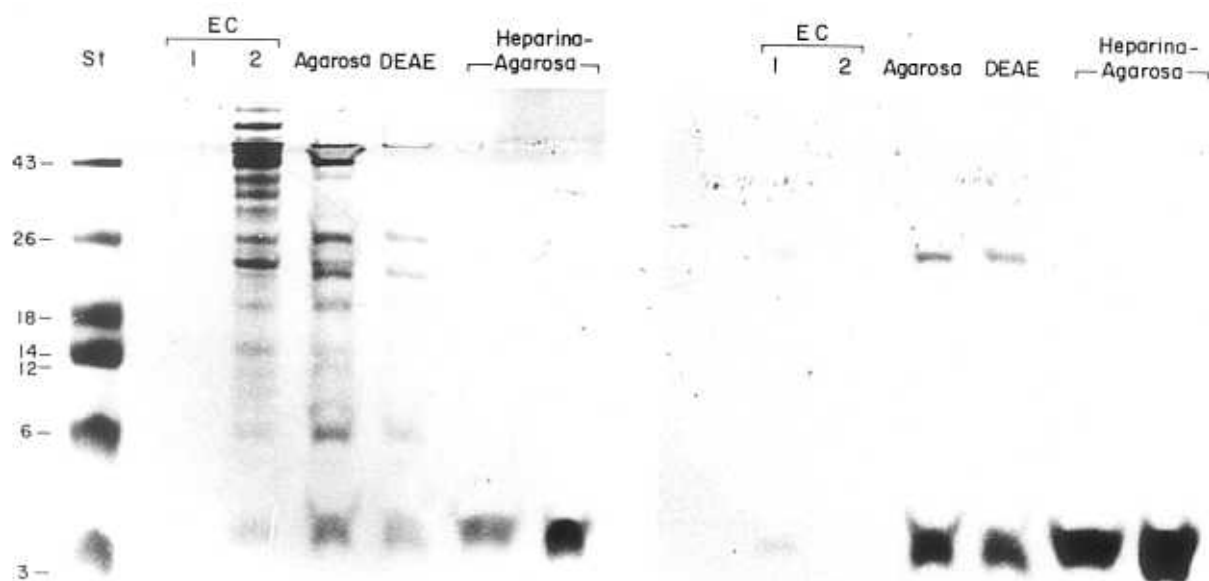


Figura 54. Análisis de las distintas etapas de purificación de RepA mediante SDS-urea-PAGE. Las proteínas totales presentes en las muestras sometidas a electroforesis fueron visualizadas (parte izquierda) mediante una tinción especial (Métodos 23.3). Las proteínas marcadas se detectaron mediante fluorografía del gel (parte derecha). Los volúmenes de las muestras aplicadas en el gel fueron: 1 μ l del extracto crudo marcado radiactivamente (EC-1); 1 μ l del extracto crudo obtenido por prensa French (EC-2); 20 μ l de la mezcla de fracciones elegidas tras la cromatografía en agarosa; 20 μ l de la mezcla de fracciones elegidas tras la cromatografía en DEAE-Sephacel; 10 y 20 μ l de la mezcla correspondiente a RepA pura (tras la cromatografía en heparina-agarosa). St: proteínas estándar no marcadas (ovoalbúmina, α -quimotripsinógeno, β -lactoglobulina, lisozima, citocromo c, inhibidor de la tripsina bovina, e insulina), cuyos pesos moleculares (en kDa) se indican a la izquierda.

fluorografía de geles de PAA/SDS (Fig. 53B). Las fracciones 68 a 76 (ambas incluidas) se juntaron, y dos cantidades distintas de esta mezcla se aplicaron, para su electroforesis, en un gel de PAA/SDS/urea, junto con muestras de las distintas etapas de purificación de RepA. La tinción para proteínas y el fluorograma de estos geles se muestran en la Figura 54. Como se observa, el peso molecular aparente de RepA es de unos 5 kDa, que concuerda con el tamaño predicho a partir de la secuencia de nucleótidos (5112 Da). Finalmente, la proteína pura se concentró por diálisis frente a tampón B preparado sin EG y suplementado con 50 mM de KCl y 50% de glicerol, almacenándose en pequeñas alícuotas a -25°C. El rendimiento final de la purificación fue de 1 mg de RepA por litro de cultivo.

Secuencia de aminoácidos de RepA.

Debido a su pequeño tamaño, era relativamente sencillo secuenciar (y más aún que nos secuenciaran) completamente la proteína RepA purificada. Este análisis nos pareció preferible, por una serie de razones, a la simple determinación de su extremo amino. Efectivamente, habíamos notado que de existir un único error en la secuencia de DNA de pLS1 que afectara al codón de terminación de *repA* (nucleótidos 790-792), habría una sola *orf* que se extendería entre las coordenadas 655 y 1482 del DNA de este plásmido. La comparación de las proteínas sintetizadas tras la inducción, especificadas por los distintos plásmidos del sistema de expresión de *E.coli*, indicaba que la proteína que habíamos purificado estaba codificada por un gen de pLS1 que se transcribía en la misma dirección que *repB*, y que era afectado por la eliminación del fragmento PstI B del plásmido. Sin embargo, no podíamos descartar que el polipéptido en cuestión fuera un producto del procesamiento de la proteína de replicación, cuyo extremo amino no había sido aún determinado. Además, la caracterización precisa de RepA tiene importancia en estudios futuros acerca de sus estructuras secundaria y terciaria (de hecho, ya se han conseguido los primeros cristales de la proteína). Como se muestra en la Figura 55, la secuencia de aminoácidos de RepA coincide con la predicha a partir de la secuencia de DNA, aunque la identificación de tres residuos (S29, S33 y G42) fue dudosa, y otros cuatro no pudieron ser determinados (residuos E37, K40, E44 y K45). De esta forma, quedaba definitivamente confirmada la existencia del gen *repA*, que era expresado en el sistema de *E.coli*. Asimismo, podíamos descartar la existencia de una contaminación cruzada con otros péptidos de bajo peso molecular. El producto purificado no parecía haber sufrido un procesamiento post-traducciona, y conservaba la metionina en posición inicial.

```

655
ATGAAAAAAGATTGACGATAACATTAAGTGAATCGGTACTTGAAAATCTTGAAAAATGGCA-
M  K  K  R  L  T  I  T  L  S  E  S  V  L  E  N  L  E  K  M  A
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

AGAGAGATGGGGTTATCAAAATCTGCAATGATTTCTGTTGCCTTGAAAATTACAAGAAAGGT-
R  E  M  G  L  S  K  S  A  M  I  S  V  A  L  E  N  Y  K  K  G
*  *  *  *  *  *  *  ?  *  *  *  ?  *  *  *  -  *  *  -  *  ?

CAAGAAAAATAA
Q  E  K  Fin
*  -  -

```

Figura 55. Determinación de la secuencia de aminoácidos de RepA. Se muestra la secuencia de DNA que codifica para la proteína (coordenadas 655 a 792) y los residuos predichos a partir de esta secuencia. Las identidades entre los aminoácidos predichos y los determinados en el análisis de la proteína pura se indican por (*); (?), posible identidad; (-), resultado poco claro.

Peso molecular de la proteína RepA nativa.

Hemos utilizado dos métodos distintos para determinar la configuración nativa de la proteína: sedimentación a través de un gradiente de glicerol del 15% al 35%, y filtración en gel de agarosa, comparando en ambos casos con marcadores de peso molecular apropiado (Fig. 56). No hemos podido usar Sephadex para la filtración en gel porque RepA se retiene en esta matriz, como ocurre a veces con proteínas básicas de pequeño tamaño. Según los resultados obtenidos en la sedimentación en gradientes de glicerol, RepA tendría aproximadamente 9600 de peso molecular (Fig. 56A). Por su parte, en la columna de agarosa (con KCl 200 mM), RepA eluyó en una posición correspondiente a una proteína con un peso molecular de 13400 (Fig. 56B). Similares resultados se obtuvieron cuando el eluyente contenía una concentración de KCl de 50 o 500 mM (no se muestran). De estos resultados y de los de SDS-PAGE de la proteína (en los que se observa una única banda polipeptídica) se puede concluir que, bajo las condiciones experimentales empleadas, RepA purificada en el sistema de *E.coli* parece ser un dímero de idénticas subunidades. Una indicación de comienzo de monomerización de la proteína se obtuvo cuando la filtración en gel se realizó en presencia de NaCl 2 M (no se muestra).

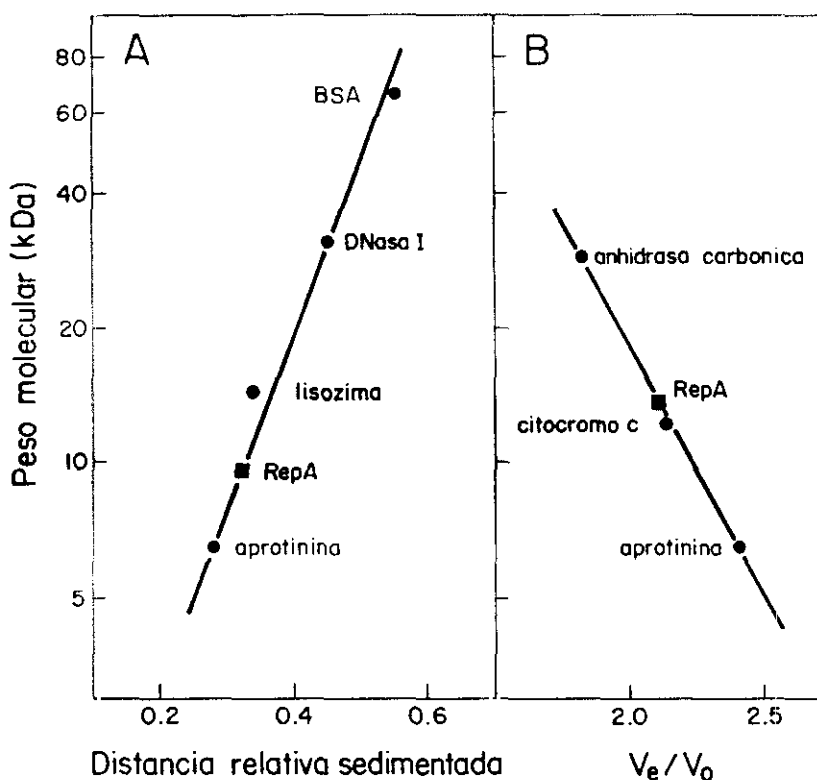


Figura 56. Configuración nativa de RepA. Sedimentación en gradiente de glicerol (A) o filtración en gel de agarosa (B) de RepA y proteínas estándar. El azul de dextrano se empleó para determinar el volumen de exclusión (V_0), y su valor se comparó con los volúmenes de elución de las proteínas (V_e). RepA se posicionó por determinación de la radiactividad debida a ^{35}S .

Características de RepA.

La característica más notable de RepA es su capacidad para unirse a DNA. A altas concentraciones, la proteína se une de forma inespecífica al DNA de pLS1, incluso en condiciones de elevada fuerza iónica (500 mM de KCl). En la Figura 57A se observa que los dos fragmentos (1847 pb y 2561 pb) resultantes de la digestión del DNA de pLS1 con EcoRI(3170) y SspI(1323) son capaces de unir RepA (que en este experimento se encuentra radiactivamente marcada), como lo demuestra la retención de los dos fragmentos en el gel de agarosa, y la presencia de radiactividad asociada a ambos (fluorograma). Además, según se desprende del análisis densitométrico de las bandas correspondientes a DNA (gel teñido con EtBr) y a proteína RepA (fluorograma), la relación proteína/DNA (en masa) es aproximadamente igual para los dos fragmentos. RepA también se une a DNAs heteroespecíficos (DNA de otros plásmidos, del fago T7, de timo de ternera, etc.). Esta característica permite la detección de la proteína por electroforesis en geles de PAA/SDS con DNA de timo en la matriz y posterior tinción

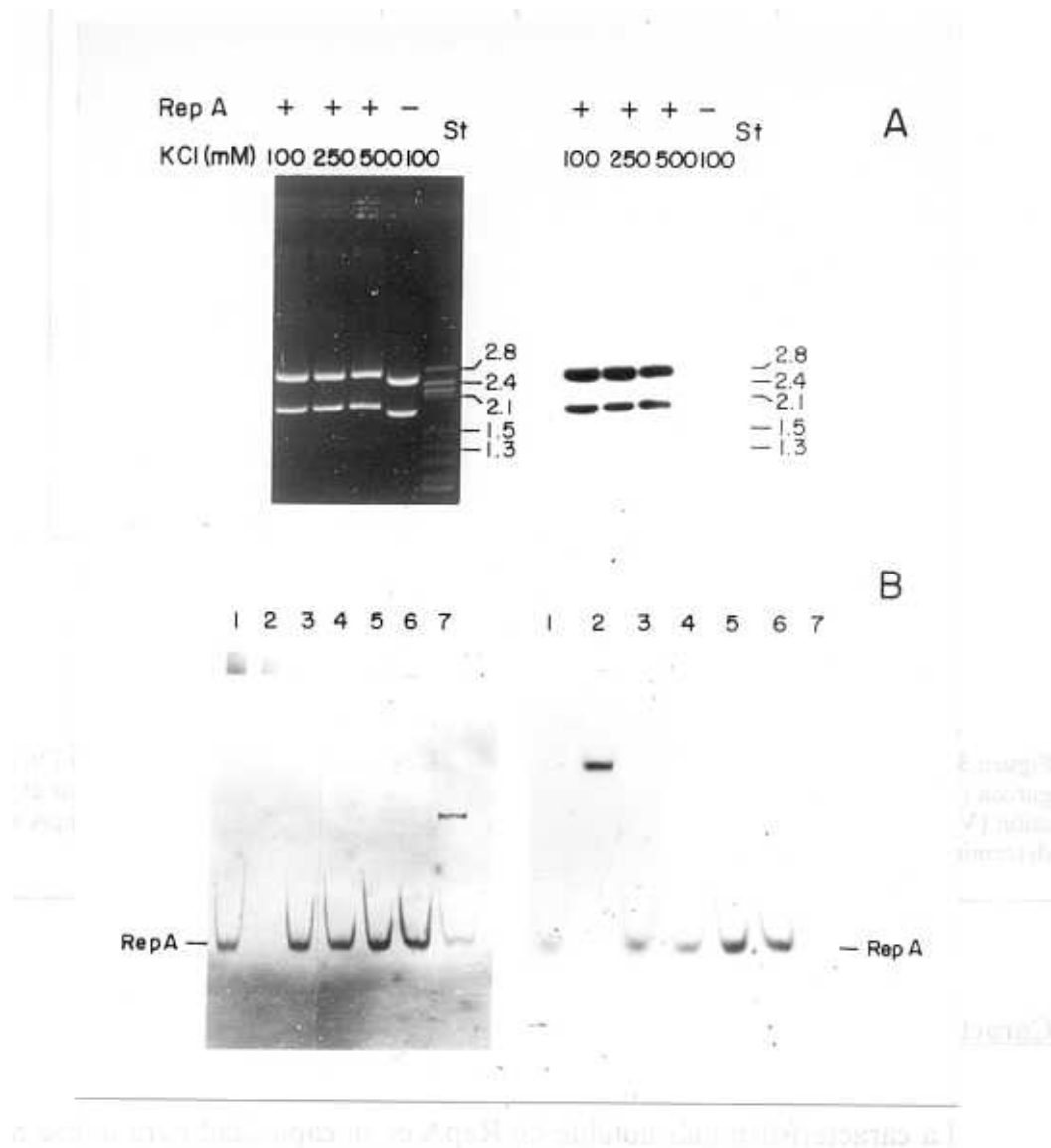


Figura 57. Unión inespecífica de RepA a DNA. **A**, unión de RepA a los dos fragmentos EcoRI-SspI de pLS1 (2561 pb y 1847 pb) en presencia de distintas concentraciones de sal. El DNA de pLS1 digerido con EcoRI y SspI (1 μ g por ensayo) se incubó durante 15 min a 20°C en ausencia (-) o presencia (+) de RepA (30 ng de la proteína pura radiactivamente marcada, 30 cpm/ng). Las mezclas de reacción (20 μ l) contenían, además, Tris-HCl 20 mM pH 8.0, DTT 5 mM, EDTA 1 mM y la concentración de KCl indicada. Ambos fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El DNA se visualizó por tinción con EtBr (parte izquierda), en tanto que la proteína unida al DNA se detectó mediante fluorografía del gel (parte derecha). St: DNA de T7 digerido con HpaII, el tamaño de los fragmentos (en kb) se indica a la derecha. **B**, Unión de RepA a la matriz de DNA en geles de PAA/SDS/DNA. La interacción se analizó por electroforesis de la proteína en un gel de PAA/SDS que contenía DNA de timo de ternera en la matriz (Métodos 23.4). Las cantidades de proteína pura aplicadas fueron: 50 ng, 75 ng, 100 ng, 150 ng y 200 ng (calles 1, 4, 3, 6 y 5, respectivamente). Como controles, se corrieron 2 μ l del extracto crudo no marcado (obtenido mediante prensa French) utilizado para la purificación de RepA (calle 7), y 150 μ l de una fracción de heparina-agarosa en el pico de radiactividad de β -Lactamasa (calle 2). Tras la electroforesis, el gel se incubó en tampón con $MgCl_2$ 2 mM, y se tiñó con EtBr (parte izquierda). El fluorograma del mismo gel se muestra a la derecha. Nótese que la β -Lactamasa no impide la tinción del DNA con EtBr, y que en el extracto crudo se revelan, por este método, tres bandas oscuras, correspondientes a RepA y a dos posibles DNAsas. La posición de las bandas correspondientes a RepA se ha señalado.

con EtBr. Esta técnica se emplea habitualmente para visualizar actividades DNásicas, de forma que, tras la electroforesis, los geles se incuban en presencia del catión deseado (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}), produciéndose la digestión del DNA de la matriz en la región ocupada por la DNasa. La posterior tinción con EtBr revela la zona en la que el DNA ha sido degradado. RepA carece de actividad DNásica, según indica la ausencia de digestión de DNAs ccc o linearizados cuando éstos se incuban con la proteína a 30°C o 37°C, en presencia de cationes divalentes (resultados no mostrados). Sin embargo, la unión de RepA al DNA de la matriz de los geles debe impedir la tinción del mismo con el agente intercalante, revelándose una mancha oscura (Fig. 57B) similar a la correspondiente a una actividad DNásica, como la que se detecta en el extracto crudo empleado para la purificación de RepA (Fig. 57B, calle 7). Según hemos comprobado, la detección de RepA, al contrario que la de una actividad DNasa, no requiere la incubación del gel en presencia de iones divalentes (no se muestra).

Las predicciones de estructura secundaria y características de RepA se obtuvieron con la ayuda de programas de computador. RepA tiene un punto isoeléctrico de 9.54, debido a sus 9 residuos fuertemente básicos. Las predicciones de la estructura secundaria de RepA por el programa PEPLOT (Gribskov y cols, 1986) muestran (Fig. 58) la existencia de un motivo α hélice-vuelta- α hélice, típico de muchas proteínas que se unen a DNA (Pabo y Sauer, 1984). Este motivo se extendería entre los residuos 12 a 24 (α hélice-1) y 29 a 37 (α hélice-2). Entre ambas α hélices se predice también la existencia de un segmento flexible que comprendería los residuos 25 a 28. Entre los residuos 5 a 9 existiría una estructura β laminar. Un momento hidrofóbico relativamente alto es observable entre los residuos 12 a 22, correspondiendo casi totalmente a la α hélice-1 (Fig. 58). Esta característica predice que una cara de dicha región da al interior de la proteína mientras que la otra mira al exterior (Gribskov y cols, 1986). La proyección a lo largo del eje de la α hélice-1 de RepA (Fig. 59A) muestra más claramente cómo la distribución de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos define dos dominios en esta α hélice. La región hidrofílica estaría expuesta al medio acuoso, en tanto que la región hidrofóbica estaría enfrentada a la α hélice-2 de RepA. El uso del programa PLOTCHOUFASMAN nos ayudó a representar el motivo α hélice-vuelta- α hélice de RepA, aunque las estructuras predichas parecen estar ligeramente desplazadas con respecto a las predicciones del PEPLOT (Fig. 59B). Los sitios antigénicos más claros se encontrarían entre los residuos 41 a 43, lo cual fue confirmado por varios programas de computador.

El putativo motivo α hélice-vuelta- α hélice de RepA (Fig. 60A) cumple todos los requerimientos propuestos por Ohlendorf y cols (1983): en las posiciones relativas 5 y 9 se localizan los residuos A y G, altamente conservados. Los residuos que ocupan las

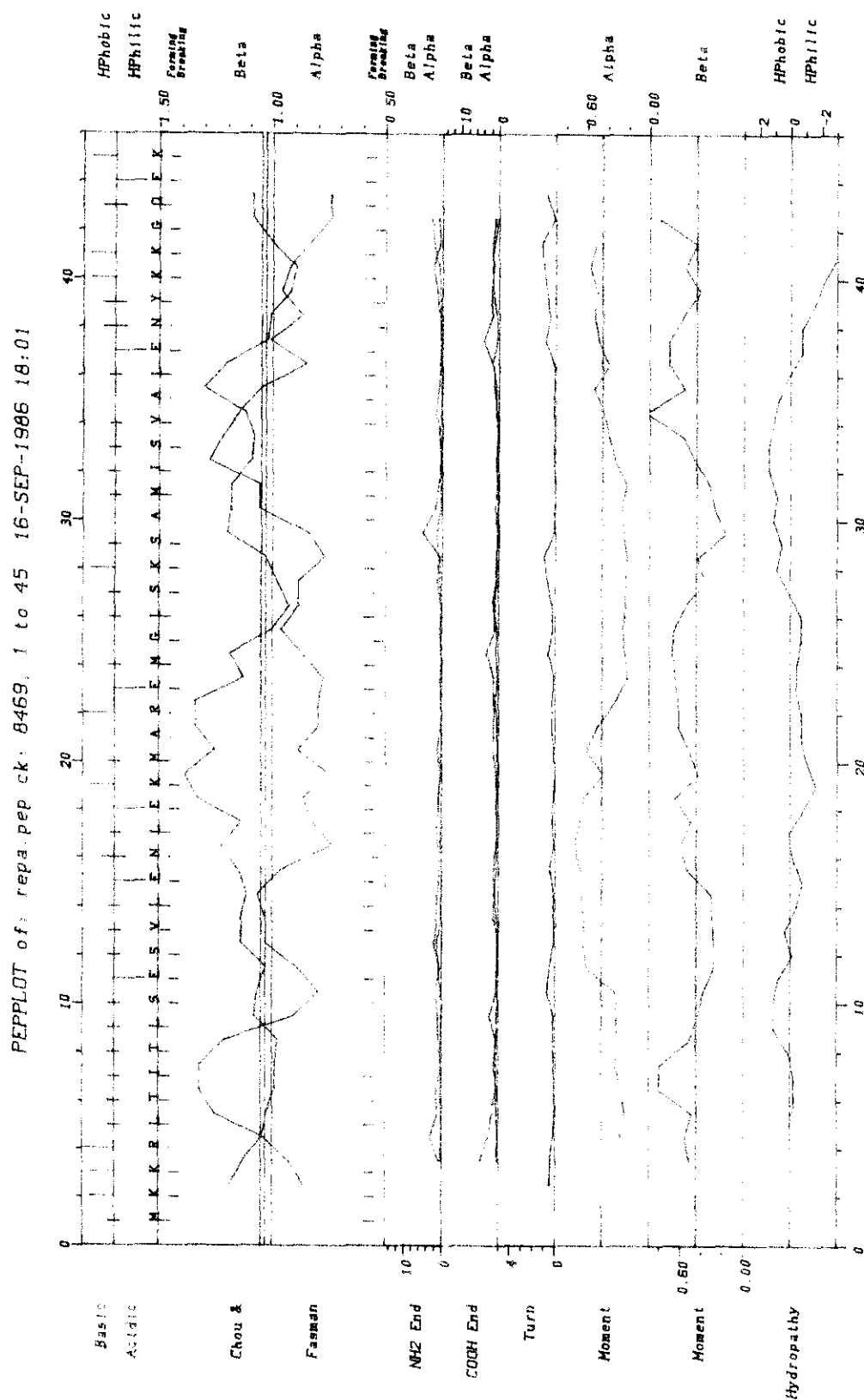


Figura 58. Predicciones del programa PEPLOT para RepA (Gribskov y cols, 1986). La parte superior muestra la secuencia y la secuencia esquemática de RepA con las características de los residuos indicadas a izquierda y derecha. Debajo se presentan los potenciales de conformación α y β , las predicciones de los extremos y los potenciales de vuelta (Chou y Fasman, 1978). Los últimos paneles recogen los momentos hidrofóbicos α y β , y el perfil de hidropatía, basados en las predicciones de Kyte y Doolittle (1982).

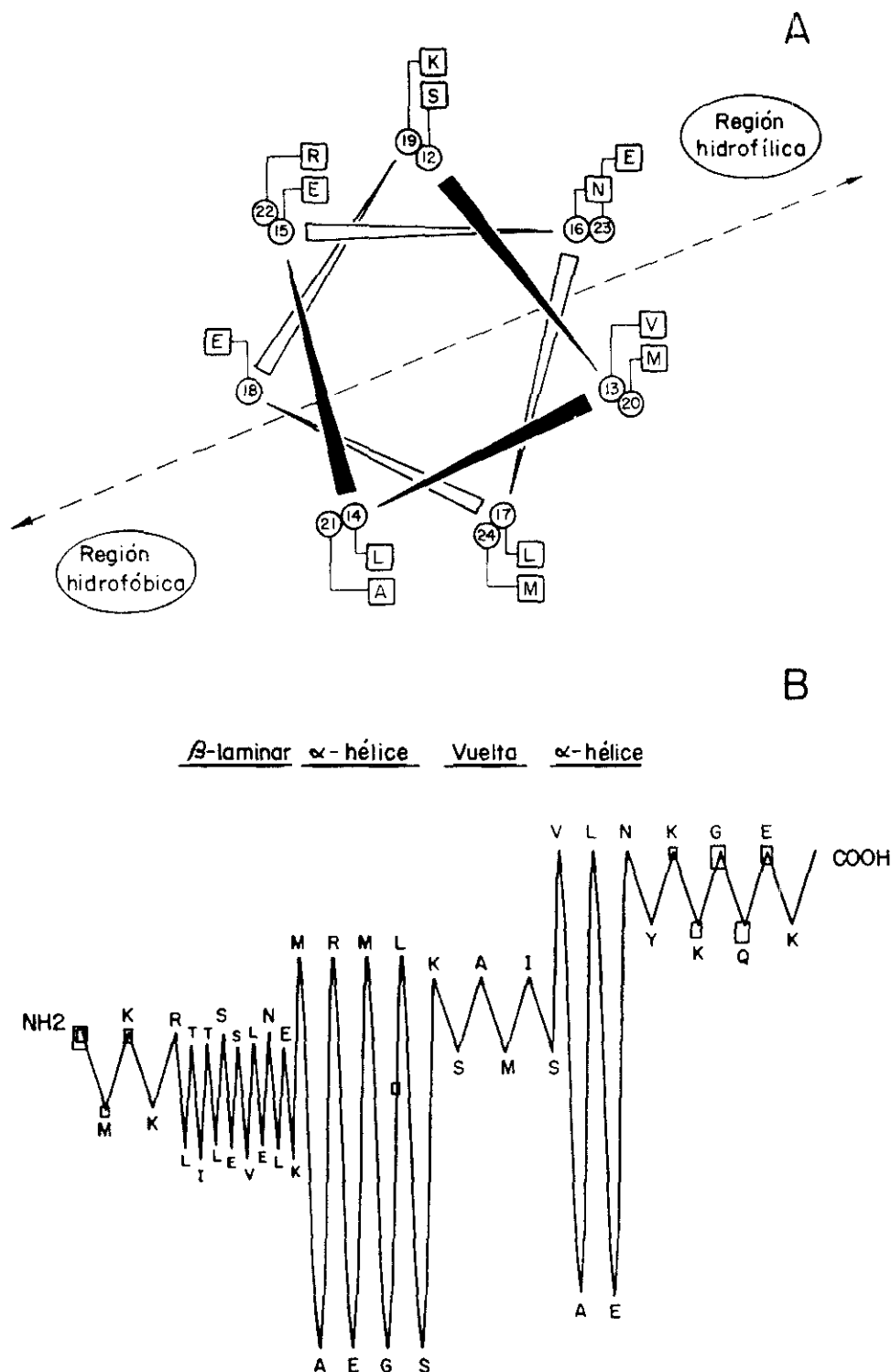


Figura 59. Predicciones de la estructura secundaria de RepA y representación de la putativa α hélice-1. **A**, proyección a lo largo de su eje de la α hélice-1 de RepA predicha por el programa PEPLOT (Fig. 58). Se representan los residuos 12 a 24 de la proteína. Aparecen superpuestos los residuos que coinciden sobre una misma generatriz del cilindro descrito por la α hélice. Una cara hidrofóbica y otra hidrofílica son claramente distinguibles. **B**, Predicciones del programa PLOTCHOUFASMAN. Se muestra la secuencia completa de RepA. En la parte superior se indican las regiones predichas como α hélice, β láminar y vuelta. Los extremos N-terminal y C-terminal de RepA podrían tener una estructura de plegamiento al azar. Los recuadros indican los sitios antígenicos más probables, que fueron confirmados por otros programas de ordenador.

A

		α -hélice				vuelta				α -hélice											
Posición		1		5		10		15		20											
RepA	17	L	E	K	M	A	R	E	M	G	L	S	K	S	A	M	I	S	V	A	L
Lambda cII	24	T	*	*	T	*	E	A	V	*	V	D	*	*	Q	I	S	R	W	K	R
Lambda Cro	16	Q	T	*	T	*	K	D	L	*	V	Y	Q	*	*	I	N	K	A	I	H
Lambda Rep	33	Q	*	S	V	*	D	K	*	*	M	G	Q	*	G	V	G	A	L	F	N
GalR	4	I	K	D	V	*	*	L	A	*	V	*	V	A	T	V	S	R	*	I	N
LacR	6	*	Y	D	V	*	E	Y	A	*	V	*	Y	Q	T	V	S	R	*	V	N
ϕ 105 R	21	Q	V	Q	L	*	E	K	A	N	*	*	R	*	Y	L	A	D	I	E	R
RK2 KorB	171	K	G	N	I	*	K	*	I	*	K	*	P	A	F	I	T	Q	H	V	T
RK2 TrfB	35	Q	A	T	F	*	T	S	L	*	*	T	R	G	*	V	S	Q	A	V	H
P22 Cro	13	Q	R	A	V	*	K	A	L	*	I	*	D	A	*	V	S	Q	W	K	E
P22 Rep	21	Q	A	A	L	G	K	M	V	*	V	*	N	V	*	I	S	Q	W	Q	R
434 Cro	19	Q	T	E	L	*	T	K	A	*	V	K	Q	Q	S	I	Q	L	I	E	A
434 Rep	17	Q	A	E	L	*	Q	K	V	*	T	T	Q	Q	S	I	E	Q	L	E	N
Tn10 Tet R	27	T	R	*	L	*	Q	K	L	*	V	E	Q	P	T	L	Y	W	H	V	K
Trp R	66	Q	R	E	L	K	N	*	L	*	A	G	I	A	T	I	T	R	G	S	N
Mata	117	K	*	E	V	*	K	K	C	*	I	T	P	L	Q	V	R	V	W	C	N

B

RepA (1,19)	M	K	K	R	L	T	I	T	L	S	E	S	V	L	E	N	L	E	K
TrfB (1,19)	*	*	*	*	*	*	E	S	Q	F	Q	E	A	I	Q	G	*	*	V
P22 antirep (72,90)	*	*	*	*	*	M	G	C	I	P	L	K	K	*	N	G	W	L	F
R1 CopB (35,53)	A	R	*	*	*	H	K	E	I	K	V	F	V	K	*	P	L	*	
434 Cro (9,27)	K	*	R	*	*	I	A	L	K	M	T	Q	T	E	*	A	T	K	A
Lambda cIII (6,24)	A	G	W	P	V	A	G	C	P	*	*	*	L	*	*	R	I	T	R

Figura 60. Comparación de regiones de RepA con las de otras proteínas reguladoras. **A**, motivo α hélice-vuelta- α hélice de RepA comparado con el de otros represores. Se indica la posición del primer residuo del motivo en la proteína, así como las posiciones relativas de los residuos en el motivo. **B**, comparación del extremo N-terminal de RepA con regiones homólogas de varias proteínas reguladoras. Las posiciones de los residuos inicial y final de las regiones representadas se indican entre paréntesis. (*) significa identidad de aminoácidos con RepA. Los residuos funcionalmente homólogos a los correspondientes en RepA se han recuadrado en **B**.

posiciones relativas 4 (M), 8 (M), 10 (L) y 15 (M) son hidrofóbicos, en tanto que en las posiciones 3 y 7 se localizan aminoácidos hidrofílicos (K y E, respectivamente). De acuerdo con esto, podíamos predecir que los residuos en las posiciones relativas 1, 2, 6, 11-13, 16, 17, y 20 estarían involucrados en una posible interacción con el DNA cuando la proteína se uniera a éste (Ohlendorf y cols, 1983). La estructura general de RepA en su motivo de unión a DNA recuerda a la de las proteínas Represor y Cro de los fagos lambda y 434, que han sido caracterizadas en profundidad (Ptashne, 1986). En base a la homología con estas proteínas, podríamos definir la α hélice-1 de RepA desde el residuo 17 al 24, y la α hélice-2 del residuo 28 al 36. Cuando aplicamos el método sistemático de Dodd y Egan (1987), el valor de RepA para los residuos en posiciones relativas 1 a 20

(Fig. 60A) fue 807. Aplicando la nueva matriz de Dodd y Egan (1990), el valor obtenido fue 1.98, próximo al valor 2.2 reportado para TrpR. En el motivo α hélice-vuelta- α hélice hemos encontrado homologías entre RepA y una serie de represores (incluidos Represor y Cro de los fagos lambda y 434) (Fig. 60A). Cuando se buscan homologías con RepA utilizando el banco de datos P.I.R., el valor más alto corresponde a los residuos 340 a 384 de la involucrina humana (33% de identidad en una región de 36 aminoácidos; no se muestra). El segundo valor más alto se obtiene con el represor TrfB del plásmido RK2 (25% de identidad en una región de 32 aminoácidos). En este caso, la homología más fuerte está localizada en los extremos amino-terminales de RepA y TrfB. También hemos encontrado homología con RepA a nivel de regiones amino-terminales en las proteínas lambda cIII y Cro de 434 (Fig. 60B). Esto sugeriría un papel funcional del extremo amino de estas proteínas, aparte de (o conjuntamente con) el papel del dominio de unión a DNA. En este sentido, es interesante señalar que el brazo N-terminal del Represor de lambda abraza al DNA y hace contactos en el surco mayor por la "cara de atrás" de la doble hélice (Jordan y Pabo, 1988). Por otro lado, también hemos encontrado homologías entre la región amino-terminal de RepA y una región distinta tanto del represor CopB del plásmido R1 como del Antirrepresor del fago P22 (Fig. 60B).

Como ya hemos comentado, la caracterización de la naturaleza de la mutación *cop7* a nivel de su secuencia de nucleótidos ha demostrado que se trata de una transversión C \rightarrow A en la coordenada 743. Este cambio en una sola base resulta en la sustitución del residuo A en posición 30 por un residuo E. El número de copias del plásmido mutante pLS1*cop7* es de aproximadamente 120, comparado con las 22 copias estimadas para el plásmido silvestre pLS1. Todavía no hemos purificado la proteína mutante (RepA7), pero la predicción de su estructura secundaria por los programas que hemos mencionado anteriormente no muestra ninguna alteración sustancial con respecto a la proteína RepA silvestre. Tan sólo se predice un incremento en su índice hidrofílico, y una ligera disminución en su punto isoeléctrico (9.19). Sin embargo la mutación se localiza en la α hélice-2 de la proteína (dentro del putativo motivo de unión a DNA), y la naturaleza del cambio es relevante (un residuo hidrofóbico por un residuo fuertemente ácido). Esto podría explicar que la funcionalidad de la proteína mutante se encuentre profundamente alterada, como se verá después.

Basándonos en comparaciones previas (Piggot y Hoch, 1985), parece que el uso de codones de *repA* es más similar al de los genes de *B.subtilis* que al de los de *E.coli*, aunque el codón de uso infrecuente UUG (L, 14% para *B.subtilis* y 9% para *E.coli*) es utilizado en *repA* con una frecuencia del 33%. En el momento actual es, sin embargo,

premature asignar esta diferencia a una característica especial del uso de codones de los genes de estreptococos.

Localización de la diana de RepA.

La primera aproximación para determinar la región del DNA de pLS1 a la que se une RepA se realizó mediante ensayos de retardo en gel de complejos DNA-proteína.

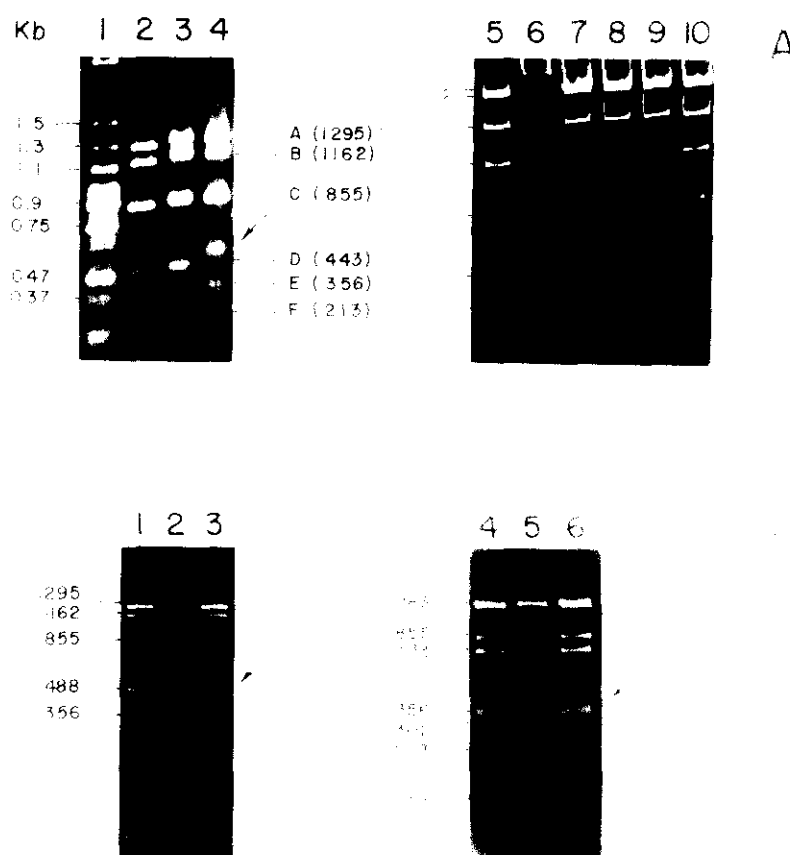


Figura 61. Localización de la diana de RepA: ensayos de retardo en gel de complejos RepA-DNA. **A**, retraso específico en la migración electroforética del fragmento HinFI D de pLS1 acompañado con RepA, analizado en geles de agarosa al 1% (izquierda) o PAA al 5% (derecha). Las mezclas de reacción (25 μ l) contenían Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 100 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, 0.8 μ g de DNA de pLS1 digerido con HinFI y las siguientes cantidades de RepA: 0 ng (calles 2, 3, 5, y 10), 15 ng (calles 4 y 9), 30 ng (calles 6 y 8), y 60 ng (calle 7). Algunas muestras contenían, también, 40 μ g de DNA competidor de T7 (calles 3, 4, y 7 a 10). Las mezclas se incubaron a 20°C durante 15 min y se sometieron a electroforesis. Los tamaños de los fragmentos se indican en el centro (nótese que el fragmento G de 84 pb se ha escapado de los geles). La flecha señala el fragmento HinFI D, retenido específicamente por unión de RepA. Calle 1: estándar de longitud molecular (DNA de T7 digerido con HpaII; el tamaño de los fragmentos se indica a la izquierda). **B**, Localización del fragmento diana de RepA en los DNAs de pLS1 Δ A4 y pLS1 Δ 24. 0.8 μ g de DNA de pLS1 Δ A4 digerido con HinFI (calles 1 a 3) o de pLS1 Δ 24 digerido con HinFI + NcoI (calles 4 a 6) se incubaron, en presencia de 40 μ g de DNA de T7 y en las condiciones expuestas en **A**, con 0 ng (calles 1 y 4), 15 ng (calles 2 y 5) y 30 ng (calles 3 y 6) de RepA. La migración de los fragmentos fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño de los fragmentos se indica en el margen izquierdo de cada gel. Las flechas señalan la posición de los fragmentos específicamente retenidos.

Estos experimentos (Fig. 61) muestran que RepA actúa específicamente sobre el fragmento Hinfl D de pLS1 (coordenadas 242 a 685), dentro del cual se localiza el promotor P_{AB} para la transcripción conjunta de *repA* y *repB*. Para conseguir condiciones de especificidad, la formación de complejos DNA-proteína se llevó a cabo en presencia de un exceso (50x en masa) de DNA competidor del fago T7. Cuando se analizan en geles de agarosa las movilidades electroforéticas de los fragmentos Hinfl de pLS1 (Fig. 61A, parte izquierda), se observa que la sola presencia del DNA de T7 (aún sin adición de RepA, calle 3) produce un retardo de todos los fragmentos de restricción, probablemente debido a un atrapamiento de los fragmentos como consecuencia de la gran cantidad y alto peso molecular del DNA usado como competidor. La adición de RepA al DNA de pLS1 digerido con Hinfl (en presencia del DNA de T7, calle 4) produce un retardo significativo del fragmento Hinfl D. Este tipo de análisis se realizó también en geles de PAA no desnaturizantes (Fig. 61A, parte derecha), observándose en este caso la desaparición del fragmento Hinfl D, especialmente a altas concentraciones de RepA (calles 7 y 8). Cuando el DNA competidor se omite (calle 6), se produce la unión inespecífica de RepA a todos los fragmentos del DNA de pLS1. En el fragmento Hinfl D, sobre el que RepA actúa de forma específica, se ha localizado una de las curvaturas intrínsecas (dirigidas por secuencia) del DNA de pLS1, cuyo centro se encuentra unos 50 pb corriente abajo del promotor P_{AB} (Pérez-Martín y cols, 1988). Además, la unión de RepA a su blanco induce un fuerte doblamiento del DNA en las proximidades del sitio ApaLI (coordenada 607) (Pérez-Martín y cols, 1989).

Para precisar más la región de unión a RepA dentro del fragmento Hinfl D, utilizamos dos derivados delecionados de pLS1: pLS1 Δ 24 y pLS1 Δ A4 (Fig. 62). Como ya hemos visto, el primero de estos plásmidos presenta una deleción de 570 pb que incluye las coordenadas 4240 a 401. Por su parte, la deleción en pLS1 Δ A4 elimina la secuencia que codifica para RepA, puesto que incluye desde la coordenada 649 a la 816. Ya que ambos derivados presentan el sitio específico para RepA dentro del fragmento que lleva la secuencia de reconocimiento por ApaLI, según se deduce de ensayos de retardo en gel de complejos DNA-proteína (Fig. 61B), esta combinación de plásmidos permite localizar dicho sitio en una región de 247 pb que contiene el *ori*(+) y el promotor P_{AB} .

Una manera sencilla de localizar la diana de una proteína que se une a DNA es el análisis de la protección de los complejos DNA-proteína frente a la digestión por enzimas de restricción. La región de 247 pb donde habíamos definido la diana de RepA incluye el sitio único ApaLI de pLS1 (coordenada 607), localizado dentro del promotor

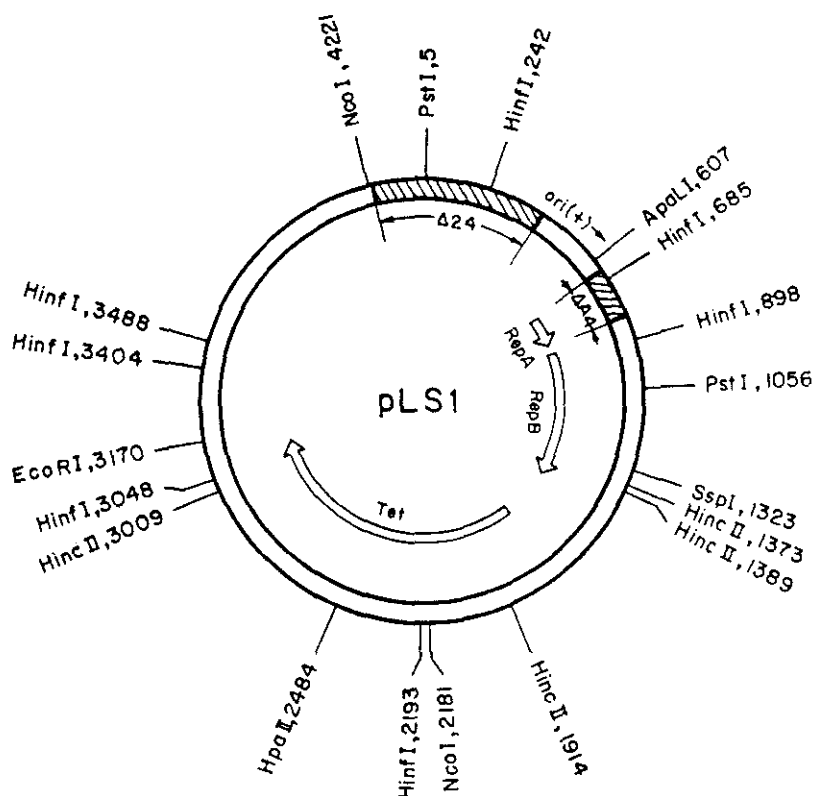


Figura 62. Mapa de pLS1 con los sitios de restricción pertinentes para los ensayos de localización de la diana de RepA. En el interior se indican las *orfs* para las tres proteínas codificadas por el plásmido. Se muestran también la posición del *ori*(+) y la dirección de síntesis de la cadena líder, así como las regiones deletionadas en pLS1ΔA4 (ΔA4) y pLS1Δ24 (Δ24).

P_{AB} (Fig. 38). La protección de este sitio ApaLI por RepA se ensayó con los plásmidos pLS1Δ24 y pLS1ΔA4 (Fig. 62). El DNA de cada uno de estos plásmidos se digirió con HincII; los tamaños de los fragmentos generados son: 2202, 1095, 525 y 16 pb (para pLS1Δ24), y 2604, 1095, 525 y 16 pb (para pLS1ΔA4). En uno y otro caso, el fragmento HincII mayor contiene el sitio ApaLI (Fig. 62). Los fragmentos de restricción de ambos plásmidos (0.3 pmoles de cada uno) se incubaron, durante 15 min a 20°C, en presencia de varias cantidades de RepA (0, 0.4, 1.2 o 2.4 pmoles), siendo a continuación sometidos a digestión con ApaLI. Los resultados de la electroforesis de las muestras (Fig. 63A) revelan que, tras la unión de RepA, el fragmento HincII mayor de cada plásmido queda parcial (calles 2, 3 y 6, 7) o totalmente (calles 4 y 8) protegido de la digestión con ApaLI, demostrando que la región alrededor de la coordenada 607 está ocupada por la proteína. Sin embargo, podía argüirse que RepA protegía inespecíficamente al DNA frente a la acción de cualquier enzima de restricción. Para descartar o aceptar esta posibilidad, el DNA de pLS1ΔA4 (0.5 pmoles) se digirió con HinfI, y los seis fragmentos resultantes se incubaron, en las mismas condiciones que antes, con dos cantidades de RepA (2.5 o 5 pmoles) o en ausencia de la proteína. A continuación, el DNA se sometió a digestión con distintos enzimas que producen un único corte en sitios repartidos alrededor del plásmido

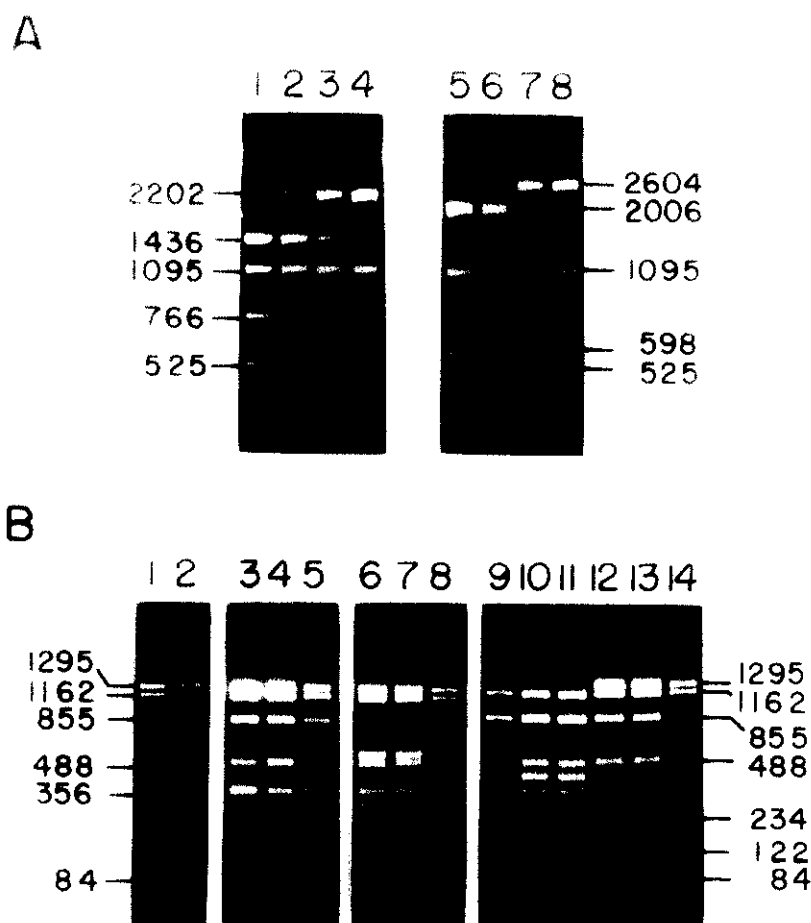


Figura 63. Protección específica por RepA del sitio ApaLI de pLS1. **A**, protección del sitio ApaLI en pLS1Δ24 y pLS1ΔA4. 0.8 μg de DNA de pLS1Δ24 (calles 1 a 4) o de pLS1ΔA4 (calles 5 a 8) digerido con HincII se incubaron (15 min a 20°C), en un volumen final de 25 μl, en presencia de Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 25 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM y las siguientes cantidades de RepA: 0 ng (calles 1 y 5), 2 ng (calles 2 y 6), 6 ng (calles 3 y 7) y 12 ng (calles 4 y 8). A continuación se añadieron 10 u de ApaLI, y la mezcla se incubó a 37°C durante 60 min. El DNA se fenolizó y precipitó, y los fragmentos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El tamaño de los fragmentos se indica a izquierda y derecha. **B**, protección del sitio ApaLI y sensibilidad frente a la digestión con HpaII, SspI y EcoRI, en presencia de RepA. 1.3 μg de DNA de pLS1ΔA4 digerido con Hinfi se incubaron, en las condiciones descritas en el párrafo anterior, con las siguientes cantidades de RepA: 0 ng (calles 1, 5, 8, 9 y 14), 12 ng (calles 2, 3, 6, 11 y 12), y 24 ng (calles 4, 7, 10 y 13). Algunas muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1% sin tratamiento posterior (calles 1 y 2). El resto se incubó (en las condiciones adecuadas) con 10 u de uno de estos enzimas de restricción: ApaLI (calles 3 a 5), HpaII (calles 6 a 8), SspI (calles 9 a 11) o EcoRI (calles 12 a 14). Tras la fenolización y precipitación del DNA, los fragmentos se separaron mediante electroforesis. Los tamaños de los fragmentos se indican a derecha e izquierda. *Nota:* 1 μg del DNA de los plásmidos utilizados corresponde, aproximadamente, a 0.4 pmoles; 1 ng de RepA son, aproximadamente, 0.2 pmoles.

(Fig. 63B): ApaLI (calles 3 a 5), HpaII (calles 6 a 8), SspI (calles 9 a 11), y EcoRI (calles 12 a 14) (véase Fig. 62 para posicionar el sitio de corte de los distintos enzimas). Como se observa (Fig. 63B), sólo el sitio ApaLI (pero ninguno de los otros sitios de restricción) está protegido por RepA de la digestión con el enzima correspondiente. El fragmento HinFI de 488 pb, que contiene el sitio ApaLI, sólo es digerido totalmente en ausencia de RepA (Fig. 63B, calle 5). Los mismos resultados se obtuvieron cuando: i) estos experimentos se realizaron en presencia de DNA competidor; ii) el DNA monomérico superenrollado se incubó con la proteína antes de ser sometido a digestión con enzimas

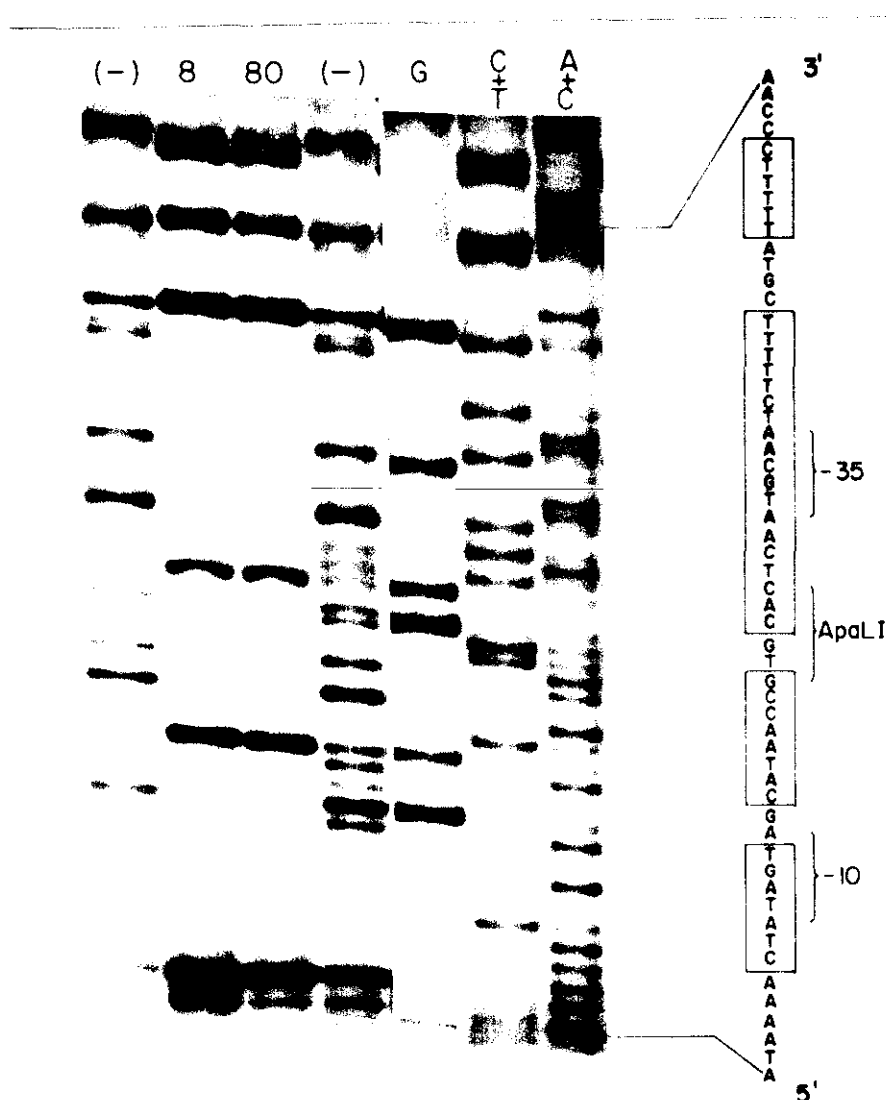


Figura 64. Localización de la diana de RepA mediante ensayos de protección frente a DNasa I. El fragmento de 302 pb NcoI-HinFI de pLS1 Δ 24, marcado en el extremo 5' generado por HinFI, se incubó en ausencia de RepA (-), o en presencia de las cantidades de proteína pura que se indican (en ng). Se incluyen los productos de las reacciones de secuencia Maxam y Gilbert (G, C+T y A+C) del mismo fragmento. La secuencia de nucleótidos de la cadena no codificante de pLS1 en la zona analizada se muestra a la derecha, con las regiones protegidas por RepA recuadradas. Las cajas -35 y -10 del promotor P_{AB}, y el sitio de reconocimiento ApaLI (coordenada 607) se indican con llaves.

de restricción; iii) se empleó el DNA de pLS1 Δ 24 en lugar del de pLS1 Δ A4; y iv) se probó la acción de otros enzimas de restricción (estos resultados no se muestran). Todo ello indica que no hay diferencias aparentes en la especificidad de RepA por DNA lineal o superenrollado, y que únicamente la región alrededor del sitio ApaLI se encuentra específicamente ocupada por la proteína.

Para definir la secuencia del DNA de pLS1 a la que se une RepA, los contactos DNA-proteína se analizaron mediante ensayos de protección frente a digestión con DNasa I. Estos ensayos se llevaron a cabo con el fragmento de 302 pb NcoI-HinfI de pLS1 Δ 24 (Fig. 62), marcado en el extremo 5' de la cadena no codificante. Este fragmento contiene el promotor P_{AB} y el sitio ApaLI, que se encuentra entre las cajas -35 y -10 de dicho promotor. En cada ensayo, 5 ng del fragmento marcado se incubaron, bien en ausencia de RepA o bien en presencia de la proteína (8 u 80 ng). El análisis electroforético de los productos de digestión con DNasa I muestra cuatro regiones protegidas por RepA, localizadas entre las coordenadas 581 y 628 (Fig. 64). Esta zona incluye el promotor P_{AB} y, por lo tanto, el sitio ApaLI. Ya que no se observan más regiones protegidas, y el fragmento utilizado incluye los tres iterones (el sitio de unión de RepB), se puede concluir que éstos no forman parte de la diana de RepA. La unión de RepA al promotor de los genes *repA* y *repB*, junto con las homologías entre esta proteína y los represores transcripcionales de origen plasmídico TrfB y CopB, sugerían una acción de RepA a nivel transcripcional, controlando su propia síntesis y la de RepB.

La proteína RepA inhibe su propio promotor *in vitro*.

Para caracterizar la acción de RepA sobre el promotor P_{AB}, realizamos una serie de experimentos de transcripción *in vitro*. En estos ensayos se sintetizaron transcritos "run-off" a partir del promotor P_{AB} presente en diferentes DNAs moldes. Cuando el fragmento de 842 pb BanI(214)-PstI(1056) de pLS1 se utiliza como molde (Fig. 65B), se obtiene un transcrito de unos 430 nts (Fig. 65A, calle 1). A juzgar por su tamaño, el RNA sintetizado correspondería a un transcrito "run-off" que comenzara a partir del promotor P_{AB}, de acuerdo con los resultados del mapeo con nucleasa S1 (Fig. 37). La banda que aparece por encima del transcrito "run-off" de 430 nts podría deberse a artefactos observados en fragmentos con extremos protuberantes, al llegar a los cuales, la RNA polimerasa no siempre abandona el fragmento (Hillen y cols, 1984). Esta interpretación vendría favorecida por el hecho de que cuando se emplea como molde un fragmento que contiene el promotor P_{AB} y que presenta extremos romos, la banda extra no se visualiza. Aparte

de éstas, no se observan más bandas mayoritarias, lo que indica que no ocurre ninguna otra iniciación o terminación significativa de la transcripción antes del sitio PstI. Dado que este sitio se localiza bastante dentro del gen *repB* (a 204 nts del inicio de su secuencia codificante), estos resultados apoyan la conclusión (ya comentada antes) de que *repA* y *repB* se transcriben en el mismo mRNA. Para confirmar que el transcrito observado comenzaba desde el promotor P_{AB} y que no existía otro promotor entre el final de *repA* (coordenada 789) y el comienzo de *repB* (coordenada 853), el fragmento de 519 pb BglI(804)-SspI(1323) de pLS1 se utilizó como molde en estos ensayos (Fig. 65B). Este fragmento comienza nada más finalizar *repA* e incluye los primeros 471 nts de *repB*. En este caso, no se observa ninguna banda del tamaño esperado para un transcrito que correspondiera exclusivamente al gen *repB* (Fig. 65A, calle 3), consistentemente con los resultados previos. Sin embargo, ya que el putativo promotor (P_{II}) para el RNA II contratranscrito (que veremos más adelante) se encuentra dentro del fragmento BanI-PstI de 842 pb, podía argumentarse que el transcrito de 430 nts observado se estaba sintetizando a partir de este promotor. Para descartar esta posibilidad, usamos como molde el fragmento de 702 pb SspI-PvuII de pCGA3 (Tabla 2). Este plásmido presenta un segmento del DNA de pLS1 (coordenadas 505 a 801) que incluye el promotor P_{AB} y el gen *repA* entero, pero no el putativo promotor P_{II} (Fig. 65B). El fragmento de pCGA3 usado como molde presenta extremos romos a ambos lados. Como resultado de estos ensayos de síntesis *in vitro* de RNA, se observa una única banda correspondiente a unos 480 nts (Fig. 65A, calle 2), lo que concuerda con un transcrito "run-off" que se iniciara en el promotor P_{AB} . Del análisis de transcripción podemos concluir que los genes *repA* y *repB* se cotranscriben a partir del promotor P_{AB} , tanto *in vitro* (Fig. 65) como *in vivo* (Fig. 37).

Para conocer si RepA inhibe *in vitro* la transcripción a partir del promotor P_{AB} , se ensayaron varias concentraciones de la proteína, empleando como molde el fragmento SspI-PvuII (702 pb) de pCGA3. Los resultados muestran que la síntesis del transcrito correspondiente es inhibida por RepA, y que el grado de inhibición depende de la concentración de la proteína en el ensayo (Fig. 65A, calles 4-7). La especificidad de la represión por RepA sobre el promotor P_{AB} se probó usando el fragmento BanI-PstI (842 pb) de pLS1 como molde para la transcripción, de forma que el putativo promotor P_{II} (localizado dentro de este fragmento) sirviera como control interno. En presencia de concentraciones crecientes de proteína RepA, el promotor P_{AB} va siendo paulatinamente callado (Fig. 65A, calles 8-11). Sin embargo, incluso a concentraciones de RepA que bloquean totalmente la transcripción a partir de este promotor, la síntesis del RNA II permanece inalterada (Fig. 65A, calles 16-18). Los experimentos anteriores se realizaron

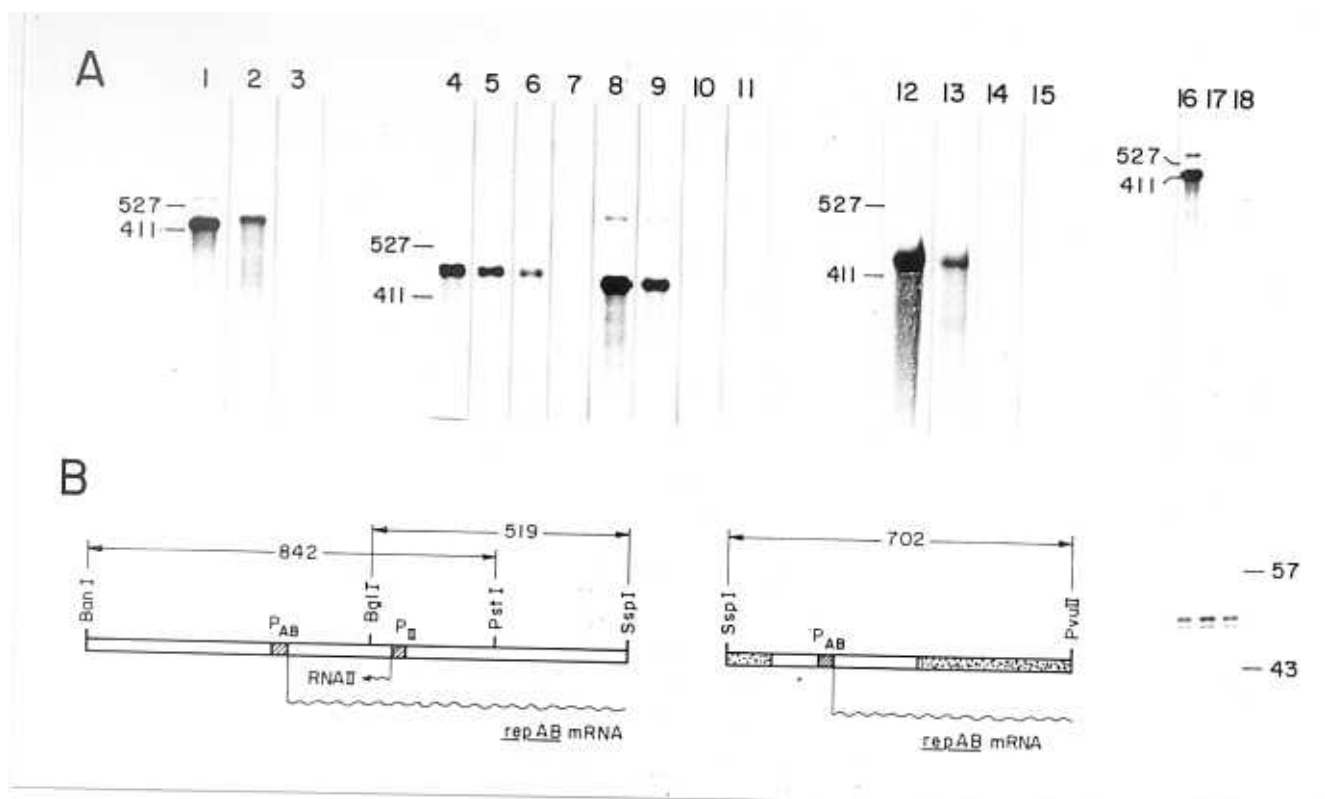
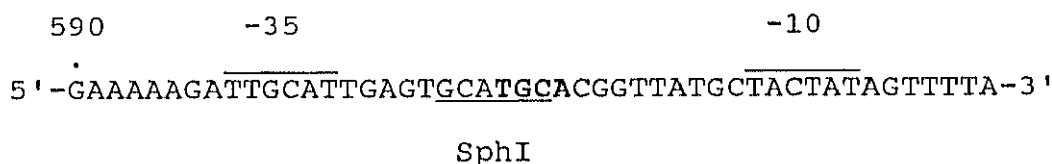


Figura 65. Efecto de RepA sobre la transcripción *in vitro* a partir del promotor P_{AB} de pLS1. **A**, transcritos sintetizados a partir de P_{AB} y, como control interno, a partir del promotor P_{II} (mostrado en calles 16 a 18). Los siguientes fragmentos de DNA (esquematizados en **B**) fueron utilizados como molde: BanI-PstI de pLS1 (calles 1, y 8 a 18); BglI-SspI de pLS1 (calle 3); y SspI-PvuII de pCGA3 (calles 2, y 4 a 7). Las mezclas de reacción se incubaron sin RepA (calles 1 a 4, 8, 12, y 16), o con las siguientes cantidades de RepA (en ng): 5 (calles 5 y 9), 20 (calles 6 y 13), 50 (calles 7, 10, 14, y 17), y 100 (calles 11, 15, y 18). En algunos ensayos (calles 12 a 15), el DNA se preincubó con RNA polimerasa antes de la adición de RepA. Los números a izquierda y derecha indican el tamaño de los marcadores usados como referencia (fragmentos DdeI de pLS1 Δ A12, marcados radiactivamente). La banda por encima del transcrito "run-off" sintetizado a partir del fragmento BanI-PstI de pLS1 podría deberse a artefactos (Hillen y cols, 1984). **B**, mapa de los fragmentos de pLS1 (izquierda) y pCGA3 (derecha) utilizados. En el fragmento SspI-PvuII de pCGA3 se indican (■) las secuencias de pC194 que rodean la región de pLS1 clonada. Los transcritos se presentan como líneas onduladas. Se muestra también la posición relativa de los promotores P_{AB} y P_{II} .

añadiendo la RNA polimerasa a los complejos RepA-DNA previamente formados. También hemos observado inhibición específica dependiente de RepA cuando ésta proteína se añade después de permitir la unión de la RNA polimerasa al DNA (Fig. 65A, calles 12-15). En este caso se detecta, aún a las concentraciones de RepA más elevadas, una transcripción residual, contrariamente a lo que habíamos observado en los experimentos anteriores (compárense las calles 10 y 11 con 14 y 15). Esto sugiere que, una vez unida, la RNA polimerasa no sería desplazada por RepA y podría iniciar una ronda de transcripción. De todos los experimentos anteriores se concluye que RepA inhibe específicamente la transcripción *in vitro* a partir de su propio promotor, y que esta represión ocurre independientemente de la presencia de secuencias adyacentes no derivadas de pLS1 (en el caso de pCGA3), que podrían alterar la estructura del DNA en esta región.

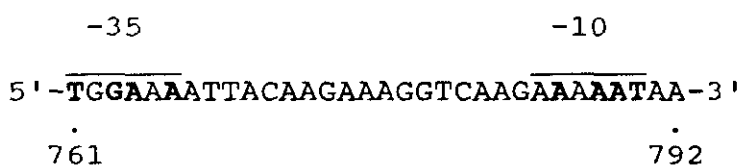
La actividad promotora y la represión por RepA de un promotor P_{AB} mutante (mutación *cop11*) han sido analizadas también mediante ensayos de transcripción *in vitro*. La mutación *cop11* se generó por linearización del DNA de pLS5 en su sitio único ApaLI (coordinada 607 del DNA de pLS1) y relleno, mediante Pol IK, de los extremos 3' recesivos generados. La mutación *cop11* consiste, por lo tanto, en la inserción de 4 pb en posición 612 (coordinada correspondiente a la secuencia de pLS1), lo que da lugar a la aparición de un sitio de restricción SphI, único en el DNA del plásmido. Esta característica permite distinguir fácilmente los transformantes que contienen el plásmido deseado, pLS5*cop11*. La secuencia de DNA correspondiente a la mutación y a las zonas adyacentes, incluyendo las cajas -35 y -10 del promotor P_{AB} , se indica a continuación:



Como consecuencia de la inserción de 4 pb (indicada en negritas), el espaciado entre ambas cajas pasa a ser de 21 pb, muy grande con respecto a la distancia consenso de 17 pb (Moran y cols, 1982). Por su parte, el espaciado del putativo promotor que solapa con P_{AB} (Fig. 36) pasaría de 15 a 19 pb. El plásmido pLS5*cop11* presenta, en *S.pneumoniae*, un número de copias sólo ligeramente mayor (1.2 veces, aproximadamente) que el de su parental pLS5. Las razones de esta manifestación fenotípica de la mutación *cop11* no están, aún, claras. Otra característica diferencial de pLS5*cop11* es que su capacidad para establecerse en pneumococos mediante transformación está disminuida con respecto a la de su parental. En estos experimentos se realizó la transferencia homoespecífica de plásmidos, empleándose concentraciones subsaturantes (0.05 μ g/ml) o saturantes (1 μ g/ml) del DNA donador (pLS5 o pLS5*cop11*). A una y otra concentración, el número de transformantes para pLS5*cop11* fue unas 2.5 veces menor que el correspondiente a pLS5. Un promotor poco eficiente en la síntesis del mRNA *repAB* podría explicar esta disminución en la eficiencia de transformación del plásmido mutante (véase más adelante y en la Discusión).

Empleando RNAs procedentes de células de pneumococos que contienen pLS5*cop11* no hemos detectado, mediante mapeo con S1, ninguna iniciación de transcripción que pudiera corresponder a un mRNA portador del mensaje de *repA* y/o *repB* (estos resultados no se muestran). Sin embargo, la expresión de *repB* debe tener

lugar, ya que el plásmido es capaz de mantenerse por sí solo en la célula huésped, para lo que necesita sus propias funciones de replicación. La posible síntesis de un mensajero de *repB* a partir del DNA de pLS5*cop11* se analizó mediante ensayos de transcripción *in vitro*, empleando como molde el fragmento PstI B de este plásmido. Dicho fragmento (723 pb, por presentar la delección de pLS5) incluye el promotor P_{AB} modificado por la mutación *cop11* (P_{AB}*cop11*) y el promotor P_{II} (Fig. 66). Entre los productos de transcripción mayores de 200 nts (los únicos que pueden llevar el mensaje de *repB*) se observa un RNA de unos 430 nts, que correspondería a un transcrito "run-off" iniciado en P_{AB}*cop11* (Fig. 66, calles 1 y 9). A pesar de que este RNA sigue siendo uno de los productos mayoritarios del ensayo, la actividad del promotor mutante está claramente disminuida con respecto a la del promotor de tipo silvestre (compárense las calles 1 con 5, y 9 con 10). Esta disminución no se debe ni a una menor concentración del DNA usado como molde ni a defectos en la purificación del mismo, ya que la cantidad de RNA II sintetizado a partir de ambos moldes (silvestre y *cop11*) fue similar (véase Fig. 78). Además del transcrito de 430 nts, se observa (Fig. 66, calle 9) una serie de productos más largos, cuyo tamaño supera, en algunos casos, el del fragmento utilizado como molde. Estos productos serían artefactos, especialmente abundantes debido a que ambos extremos del fragmento de DNA molde presentan extensiones 3' protuberantes. Por debajo de la banda correspondiente al RNA de 430 nts aparecen dos o tres bandas de menor intensidad (calle 9). Mediante una búsqueda en la secuencia de pLS1, hemos localizado una región (coordenadas 761 a 790) en la que las cajas -35 y -10 de un putativo promotor se encuentran espaciadas 18 pb. La secuencia de esta región (indicándose en negritas las coincidencias con la secuencia consenso) es:



Ya que la secuencia codificante del gen *repA* finaliza en la coordenada 789, este promotor serviría, exclusivamente, para la transcripción de *repB*. Utilizando como molde el fragmento PstI B de pLS5*cop11*, el transcrito "run-off" sintetizado a partir de este promotor putativo tendría un tamaño aproximado de unos 260 nts. Una banda correspondiente a un RNA de esta longitud se observa, efectivamente, como producto de la transcripción *in vitro* en estas condiciones (Fig. 66A, calles 9 y 11). Sin embargo, debido al carácter minoritario de esta banda y a la presencia de otras bandas, la actividad

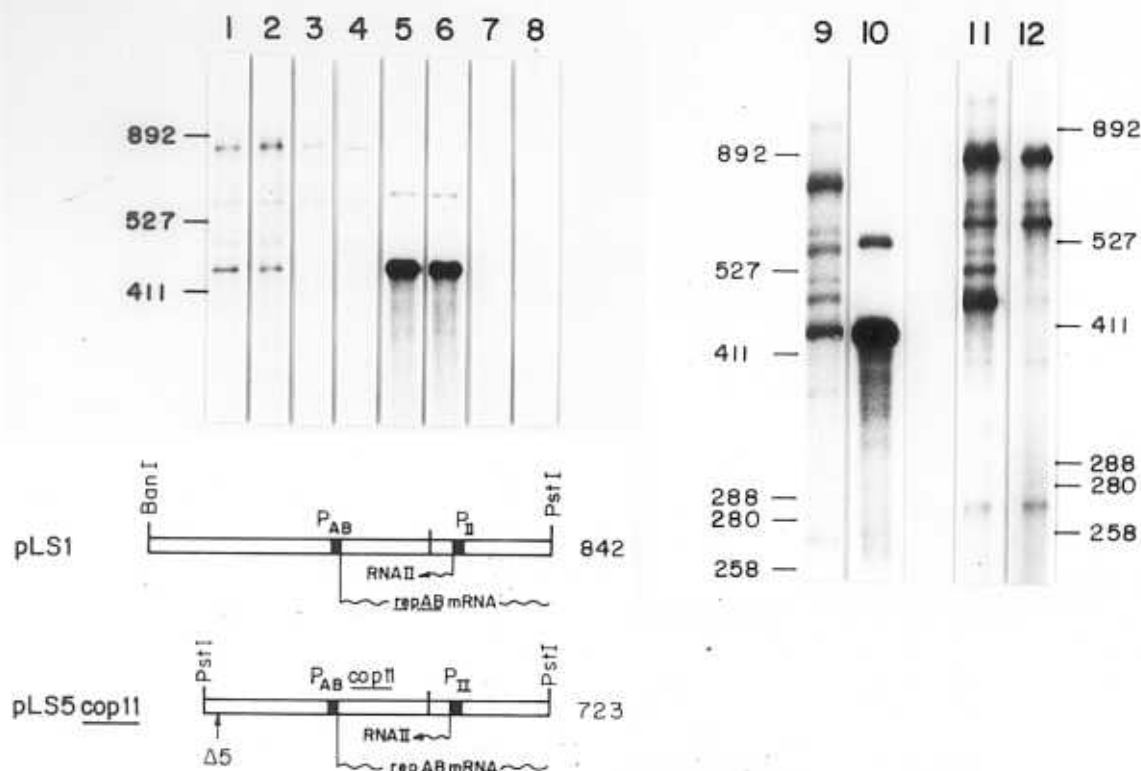


Figura 66. Actividad *in vitro* del promotor $P_{ABcop11}$ e inhibición específica por RepA. Se utilizaron como molde los fragmentos BanI-PstI de pLS1 (calles 5-8 y 10) y PstI B de pLS5cop11 (calles 1-4, 9, 11 y 12). Los mapas de estos fragmentos, indicando su tamaño, la posición relativa de los promotores $P_{AB}/P_{ABcop11}$ y P_{II} , los RNAs determinados, y la región deletionada en pLS5cop11 ($\Delta 5$), se muestran abajo. Las mezclas de reacción fueron incubadas sin RepA (calles 1, 5, y 9-11), o con las siguientes cantidades de RepA: 5 ng (calles 2 y 6), 50 ng (calles 3, 7 y 12) y 100 ng (calles 4 y 8). Los números en los márgenes izquierdo y derecho indican los tamaños de los marcadores de referencia (véase Fig. 65).

de tal promotor putativo permanece incierta. Además, en los experimentos de mapeo con S1 no hemos obtenido ninguna evidencia clara de que exista una iniciación de la transcripción correspondiente a dicho promotor, ni utilizando RNAs procedentes de pneumococos conteniendo pLS1, ni cuando los RNAs fueron obtenidos de células que llevan pLS5cop11 (no se muestra).

La acción de RepA sobre la actividad del promotor $P_{ABcop11}$ se ha ensayado *in vitro*, en experimentos en los que el DNA molde (fragmento PstI B de pLS5cop11) se incubó en presencia de distintas concentraciones de la proteína, antes de la adición de la RNA polimerasa. La proteína RepA inhibe la síntesis del transcrito de 430 nts (Fig. 66, calles 1 a 4), similarmente a lo observado en experimentos en los que se utilizó como molde el fragmento BanI-PstI de pLS1 (Fig. 66, calles 5 a 8). Por el contrario, la formación del transcrito de unos 260 nts, así como la de muchos de los grandes transcritos

que hemos considerado artefactos, no se ve afectada por la presencia de RepA (Fig. 66, calles 11 y 12). Lo mismo ocurre con la síntesis del RNA II (se verá más adelante), que sirve, por ello, como control interno indicativo de que la acción de RepA no se produce de forma inespecífica.

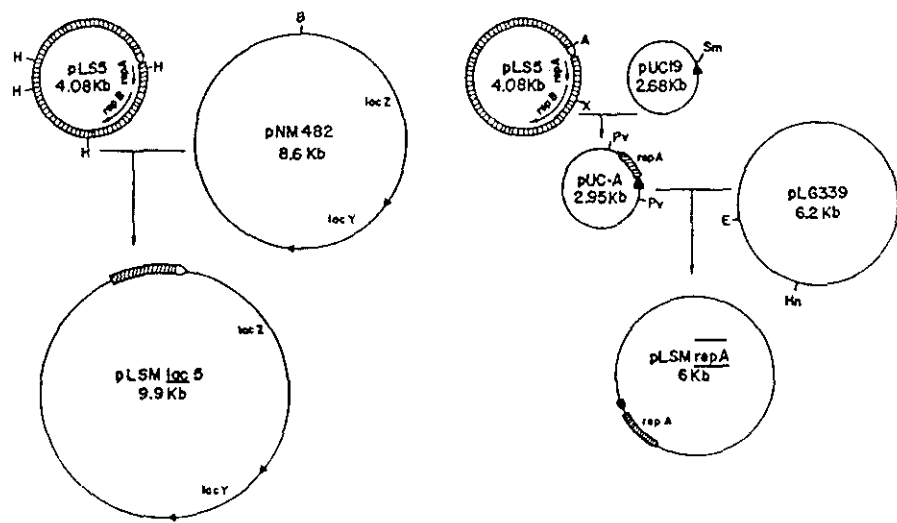
A partir de estos resultados se deduce que la mutación *cop11* disminuye la actividad del promotor P_{AB} , pero no impide la unión de RepA a su operador. Esta información es importante, ya que la mutación afecta a una región de DNA que queda protegida, por unión de la proteína, frente a la digestión con DNasa I. La proteína RepA inhibe, pues, específicamente la transcripción a partir del promotor P_{AB} , tanto silvestre como mutante, bloqueando de esta forma la síntesis del mRNA *repAB*.

RepA reprime su propio promotor *in vivo*.

Para saber si RepA reprime su propia síntesis *in vivo*, se construyeron los plásmidos pLSM*lac5* y pLSM*repA* (Fig. 67). El plásmido pLSM*lac5* contiene el fragmento HinfI de 1274 pb de pLS5 (coordenadas 3488-685 sobre la secuencia de pLS1) clonado en el sitio único BamHI del plásmido pNM482 (Minton, 1984). De esta forma, pLSM*lac5* presenta una fusión traduccional en la cual los 11 primeros residuos de RepA están fusionados al producto del gen *lacZ* de pNM482, y el gen *lacZ* está colocado bajo el control del promotor P_{AB} (Fig. 67). El otro plásmido, pLSM*repA*, se construyó en dos etapas. Primero, el fragmento de 295 pb ApaLI-XmnI de pLS5 (coordenadas 607-902 sobre la secuencia de pLS1) se clonó en el sitio SmaI de pUC19 para construir el plásmido pUC-A (Fig. 67). Esta construcción coloca el gen *repA* (sin promotor) bajo el control del promotor *lacUV5*. Además, dentro del fragmento clonado, y antes del codón de iniciación de RepA se localizan cuatro codones de terminación (que cortan las tres posibles fases de lectura), con lo que se asegura que la traducción comience, exclusivamente, a partir del codón de iniciación de *repA*. En una segunda etapa, el fragmento PvuII de pUC-A que lleva la fusión promotor *lacUV5*/gen *repA* (620 pb) se clonó en el fragmento grande EcoRI-HincII del plásmido pLG339 (Stoker y cols, 1982), dando lugar al plásmido pLSM*repA* (Fig. 67). En tanto que pLG339 presenta de 6 a 8 copias por equivalente genómico, pNM482 tiene un alto número de copias, ya que está basado en el replicón de ColE1. Ambos plásmidos son compatibles, al igual que las construcciones derivadas de ellos. Los plásmidos pLSM*lac5* y pLSM*repA* fueron transferidos, por separado o conjuntamente, a células de *E.coli* XL1-Blue, una estirpe que contiene un F' que proporciona el producto del gen *lacI*^q en *trans*. Los transformantes

para pLSMlac5, pLSMrepA, y los dobles transformantes, se seleccionaron y crecieron en presencia de Ap (50 µg/ml), Km (25 µg/ml), y Ap (50 µg/ml)+Km (25 µg/ml), respectivamente.

Para realizar los ensayos de actividad β-galactosidasa, se prepararon cultivos de cada uno de estos tipos de transformantes, que fueron crecidos en presencia o en ausencia de IPTG (apartado 29 de Métodos). En la Tabla de la Figura 67 se muestran los valores de actividad específica β-galactosidasa (unidades Miller; Miller, 1972). En ausencia de IPTG, los niveles de β-galactosidasa detectados en cultivos que presentan ambos plásmidos están disminuidos unas 4 veces con respecto a los encontrados en



Actividad específica β-galactosidasa		
Plásmido	- IPTG	+ IPTG
Ninguno	<0.7	<0.7
pLSMrepA	<0.7	<0.7
pLSMlac5	93.7	94.6
pLSMlac5 + pLSMrepA	22.8	3.7

Figura 67. Efecto *in vivo* de RepA sobre la expresión génica a partir del promotor P_{AB}. En la parte superior se muestra la estrategia seguida para la construcción de los plásmidos pLSMlac5 y pLSMrepA. Se indica la posición relativa del promotor P_{AB} al gen *lacZ* (punta de flecha blanca en pLSMlac5), y la del promotor *lacUV5* al gen *repA* (punta de flecha negra en pLSMrepA). El DNA procedente de pLS1 se presenta sombreado. Sitios de restricción: H, HinII; B, BamHI; A, ApaLI; X, XmnI; Sm, SmaI; Pv, PvuII; E, EcoRI; y Hn, HincII. En la parte inferior se recoge la actividad específica β-galactosidasa (unidades Miller; Miller, 1972) determinada en extractos de células de *E.coli* que llevaban los plásmidos indicados, cuando los cultivos se trataron o no con IPTG. Los valores indicados son la media de cuatro ensayos independientes

cultivos cuyas células contienen sólo pLSM*lac5*. Esta inesperada represión en condiciones de no-inducción, causada por la presencia de pLSM*repA*, podría deberse a la combinación de la fuerza del promotor *lacUV5* (responsable de la síntesis de RepA) con la baja dosis génica del represor *lacI^q*. Sin embargo, en presencia de IPTG se observa una represión de unas 25 veces en la síntesis de β -galactosidasa por la inducción de la expresión de *repA* en células que contienen tanto pLSM*lac5* como pLSM*repA* (Fig. 67). Estos resultados demuestran que *in vivo*, al igual que ocurre *in vitro*, el producto del gen *repA* reprime su propio promotor.

Localización del operador de RepA.

Ya hemos visto anteriormente que, mediante experimentos de digestión parcial con DNasa I de complejos DNA-RepA, se han definido sobre la cadena no codificante de pLS1 cuatro regiones protegidas por la unión de la proteína (Fig. 64). Estas regiones abarcan desde la coordenada 581 a la 628, incluyendo el promotor P_{AB}. Para localizar el operador de RepA, estos experimentos de protección se llevaron a cabo utilizando el fragmento de 179 pb Fnu4HI-HinfI de pLS1 (coordenadas 506 a 685; incluyendo también el promotor P_{AB}). Este fragmento se marcó radiactivamente en 5' o en 3' del extremo Fnu4HI, de forma que quedan marcadas, respectivamente, las cadenas codificante y no codificante. Como resultado de la digestión con DNasa I empleando el fragmento marcado en una u otra de las cadenas, se observan cuatro (en la cadena no codificante) y cinco (en la codificante) regiones protegidas por la unión de RepA. Cada zona de protección en la cadena no codificante tiene su correspondiente zona de protección en la cadena complementaria, aunque desplazada 1-3 pb (Fig. 68A, calles 5-6, 11-12, 17-18 y 27-28). Sin embargo, la segunda región (contando desde el final del gel) de la cadena no codificante aparece dividida, en la cadena codificante, en dos regiones protegidas.

Un mayor refinamiento de los contactos entre RepA y su DNA diana se consiguió mediante experimentos de protección frente a la rotura por radical hidroxilo, una técnica de alta resolución (Tullius y Dombroski, 1986). Todas las zonas de protección frente a DNasa I se detectan también por este otro método, aunque la segunda región protegida frente a la nucleasa en la cadena no codificante aparece dividida en dos cuando se aplica el método químico (Fig. 68A, calles 7-10 y 19-26). En estas condiciones, no podíamos descartar, sin embargo, la existencia de otras regiones protegidas más cercanas al comienzo de la secuencia codificante de *repA*, las cuales no serían detectables por falta de resolución en la parte superior del gel (Fig. 68). Para clarificar este punto, se corrió

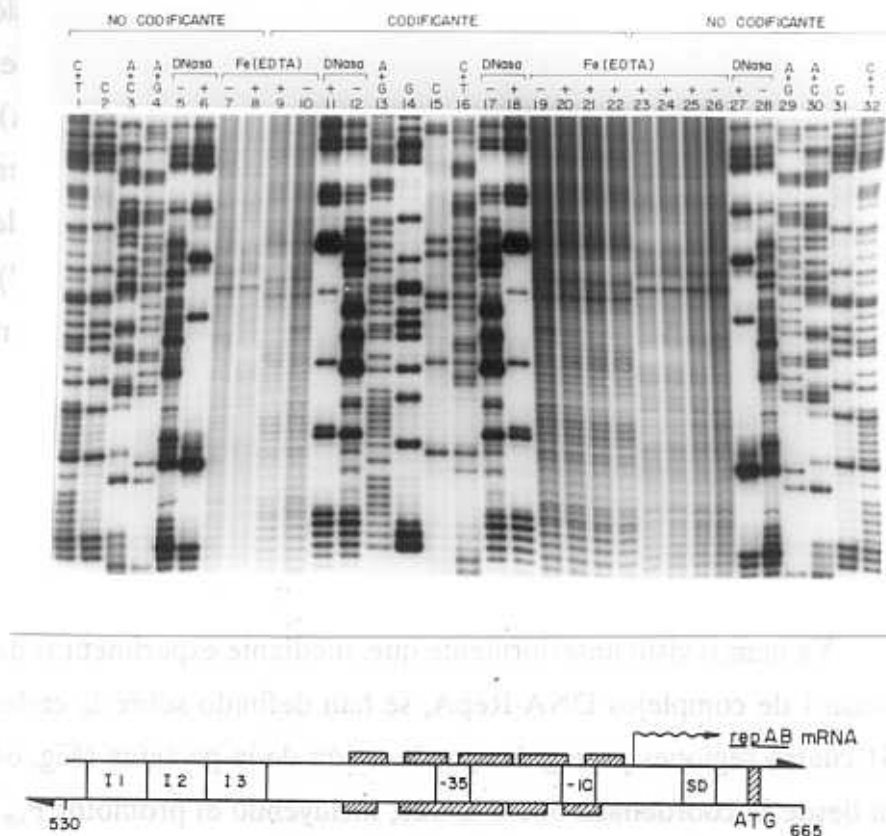


Figura 68. Contactos RepA-DNA diana analizados mediante protección frente a DNasa I y radical hidroxilo. **A**, efecto de RepA sobre el patrón de rotura de las cadenas codificante y no codificante del DNA diana. Se utilizó el fragmento Fnu4HI-Hinfi de pLS1 (179 pb, conteniendo el promotor P_{AB}), marcado radiativamente en el sitio generado por Fnu4HI, en la cadena codificante o en la no codificante (según se indica). DNasa: productos de la digestión parcial del DNA con DNasa I. Fe(EDTA): productos de la degradación parcial del DNA por radical hidroxilo. (+) y (-) indican, respectivamente, la presencia o ausencia de RepA. Las cantidades de RepA utilizadas fueron: 2 ng (calles 20 y 25), 4 ng (calles 21 y 24), y 8 ng (calles 6, 8, 9, 11, 18, 22, 23 y 27). Algunos ensayos se realizaron en presencia de 0.5 μ g de DNA de timo de ternera sonificado (calles 5 a 12). Se muestran también los productos de las reacciones de secuencia Maxam y Gilbert del mismo fragmento marcado en la cadena codificante (calles 13 a 16) o en la no codificante (calles 1 a 4, y 29 a 32). Las muestras se aplicaron en un gel de secuencia al 8% de PAA y se sometieron a electroforesis hasta que el xilencianol quedó a 3 cm del borde del gel. **B**, representación esquemática de las regiones protegidas por RepA de la digestión con DNasa I, y su posición relativa respecto a los tres iterones (I1 a I3), el promotor P_{AB} , el sitio de iniciación de la transcripción, y las señales de traducción para RepA.

un gel de PAA durante largo tiempo, no observándose la existencia de nuevas regiones protegidas (Fig. 69). Tampoco se detectan regiones protegidas adicionales más cercanas a los 3 iterones, como se evidenció corriendo geles de alto porcentaje de PAA (no se muestra). Un patrón de protección similar al mostrado en la Figura 68 se observó al emplear un fragmento de DNA distinto (no se muestra). Hay que resaltar que, en presencia de RepA, los patrones de corte del radical hidroxilo sobre una y otra hebra son simétricos. Esto es: las regiones protegidas en una misma cadena están separadas entre sí 10-11 pb, y se observa, además, un desplazamiento de 3-4 pb entre las protecciones de una cadena y las de la cadena complementaria. La primera región protegida (de abajo

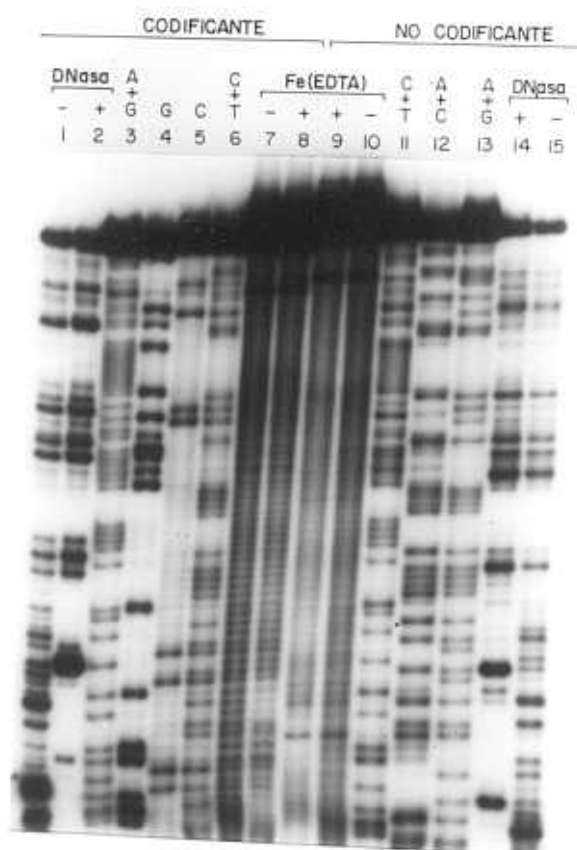


Figura 69. Visualización de los contactos RepA-DNA diana más proximales al gen *repA*. Se utilizó el fragmento *Fnu4HI-HinfI* de pLS1 (179 pb), marcado en el sitio *Fnu4HI* en una u otra cadena (según se indica). DNasa: productos de la digestión parcial del DNA por DNasa I. Fe(EDTA): productos de la degradación parcial del DNA por radical hidroxilo. (-), ensayos realizados en ausencia de RepA. (+), ensayos realizados en presencia de 8 ng de RepA. Se incluyen también los productos de las reacciones de secuencia Maxam y Gilbert del fragmento marcado en la cadena codificante (calles 3 a 6) o en la no codificante (calles 11 a 13). Las muestras se aplicaron a un gel de secuencia al 6% de PAA, y se realizó la electroforesis hasta que el xilencianol alcanzó el borde del gel.

hacia arriba en el gel; Fig. 68, calles 7-10) apenas se detecta, a pesar de ser ésta la región más cercana al extremo marcado, y por lo tanto la que mejor se resuelve en el gel. La quinta región protegida (la más distal con respecto a la marca; calles 7-10) es también bastante débil. Idénticos resultados se obtienen cuando los experimentos de protección frente al agente químico se realizan con el mismo fragmento, pero marcado en el extremo *HinfI* en una u otra cadena (los resultados no se presentan). Esto indica que la débil protección frente a la rotura del esqueleto del DNA, observada en las regiones protegidas más externas, no se debe a su posición relativa con respecto a la marca. Tampoco se debería a una cantidad insuficiente de RepA en el ensayo, ya que observamos el mismo patrón de corte cuando se incrementa 10 veces la concentración de RepA utilizada (no se muestra). En la cadena no codificante se observa claramente una posición hiperexpuesta a la rotura por el radical hidroxilo, tanto en ausencia como en presencia

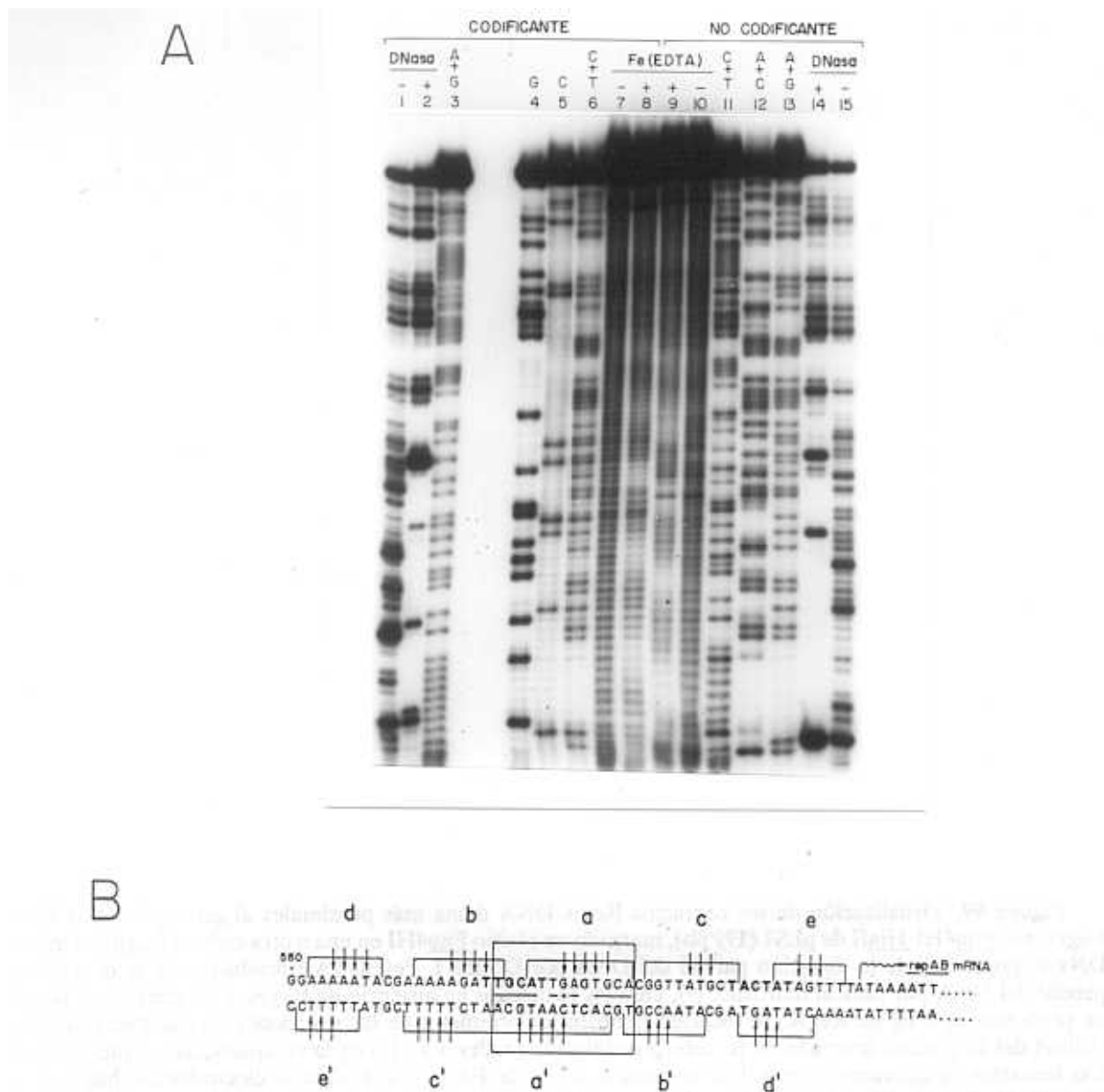


Figura 70. Simetría de los contactos RepA-DNA diana. A, simetría revelada mediante ensayos de protección del DNA acomplejado a la proteína frente a la degradación por radical hidroxilo y DNasa I. Se utilizó el fragmento Fnu4HI-HinfI de pLS1 (179 pb) marcado, en el sitio Fnu4HI, en una u otra cadena (según se indica). DNasa: productos de la digestión parcial del DNA por DNasa I. Fe(EDTA): productos de la degradación parcial del DNA por radical hidroxilo. (-), ensayos realizados en ausencia de RepA. (+), ensayos realizados en presencia de 8 ng de RepA. Se incluyen los productos de las reacciones de secuencia Maxam y Gilbert del fragmento marcado en la cadena codificante (calles 3 a 6) o en la no codificante (calles 11 a 13). Las muestras se aplicaron a un gel de secuencia al 6% de PAA, realizándose la electroforesis hasta 24 min antes de que el xilencianol alcanzara el borde del gel. **B,** resumen de las regiones protegidas por la unión de RepA a su diana frente a la degradación química o enzimática del DNA. El elemento simétrico de 13 pb se muestra incluido en una caja, las bases simétricas se han subrayado, y el eje de simetría se indica por un punto. Las secuencias -35 y -10 del promotor P_{AB} se muestran en negritas. Las regiones protegidas en ambas cadenas frente a la degradación por DNasa I se incluyen entre corchetes. Las bases cuyas desoxirribosas están protegidas por RepA del ataque por radical hidroxilo se señalan con flechas. Las regiones nombradas con la misma letra (en cadenas complementarias) son simétricas respecto a un eje imaginario situado en el par GC central del elemento de 13 pb.

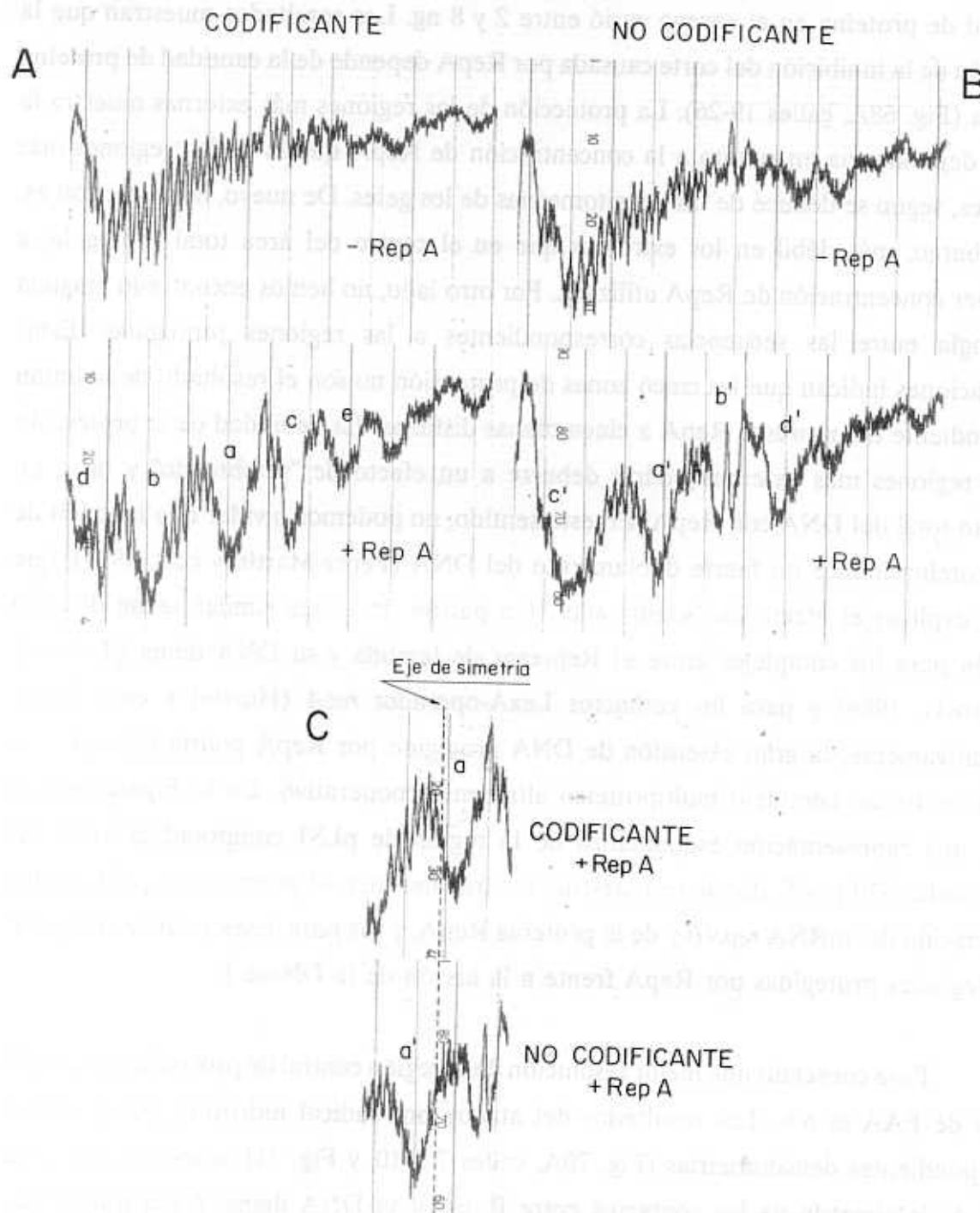


Figura 71. Efecto de RepA sobre el patrón de rotura por radical hidroxilo de las cadenas codificante y no codificante del DNA diana. Se muestra el perfil densitométrico correspondiente a las calles 7 y 8 (A), y 9 y 10 (B) del autorradiograma mostrado en la Figura 70A. Las regiones protegidas por RepA denominadas con la misma letra en una y otra cadena, presentan una posición simétrica respecto a un hipotético eje que pasara por el par GC central del elemento de 13 pb. Nótese que la región 'e' no es visible porque los productos de reacción correspondientes se han escapado del gel. La región protegida central en la cadena codificante y no codificante (a y a', respectivamente) se muestran con más detalle en C. El hipotético eje de simetría pasa a través de los picos correspondientes al par GC central del elemento de 13 pb.

de RepA. Esta posición corresponde al residuo A presente en la coordenada 615 (Fig. 68A, calles 7-8 y 23-26; y Fig. 69, calles 9-10). Este hecho podría deberse a la existencia de una deformación local de la hélice del DNA en esta posición precisa. Para determinar si RepA exhibe una mayor afinidad por cualquiera de las regiones a las que protege, se realizó un experimento de protección frente al corte por radical hidroxilo, en el cual la cantidad de proteína en el ensayo varió entre 2 y 8 ng. Los resultados muestran que la extensión de la inhibición del corte causada por RepA depende de la cantidad de proteína añadida (Fig. 68A, calles 19-26). La protección de las regiones más externas muestra la misma dependencia en cuanto a la concentración de RepA que la de las regiones más centrales, según se deduce de las densitometrías de los geles. De nuevo, la protección es, sin embargo, más débil en los extremos que en el centro del área total protegida, a cualquier concentración de RepA utilizada. Por otro lado, no hemos encontrado ninguna homología entre las secuencias correspondientes a las regiones protegidas. Estas observaciones indican que las cinco zonas de protección no son el resultado de la unión independiente del represor RepA a cinco dianas distintas. La debilidad de la protección en las regiones más externas podría deberse a un efecto de "sombreado" y no a un contacto total del DNA con RepA. En este sentido, no podemos olvidar que la unión de esta proteína induce un fuerte doblamiento del DNA (Pérez-Martín y cols, 1989), que podría explicar el efecto de "sombreado". Un patrón de cortes similar se ha descrito también para los complejos entre el Represor de lambda y su DNA diana (Tullius y Dombroski, 1986) y para los contactos LexA-operador *recA* (Hurstel y cols, 1988). Alternativamente, la gran extensión de DNA protegido por RepA podría deberse a la formación de un complejo multiproteico altamente cooperativo. En la Figura 68B se ofrece una representación esquemática de la región de pLS1 comprendida entre las coordenadas 530 y 665, donde se muestran los tres iterones, el promotor P_{AB}, los puntos de iniciación del mRNA *repAB* y de la proteína RepA, y sus posiciones relativas respecto a las regiones protegidas por RepA frente a la acción de la DNasa I.

Para conseguir una mejor resolución de la región central de protección, se corrió un gel de PAA al 6%. Los resultados del ataque por radical hidroxilo, junto con las correspondientes densitometrías (Fig. 70A, calles 7 a 10, y Fig. 71) muestran una clara visión de la simetría de los contactos entre RepA y su DNA diana. Cada una de las regiones protegidas en la cadena codificante frente a la acción del radical hidroxilo tiene su correspondiente reflejo en la cadena no codificante, a través de un hipotético eje de simetría diádica. Este eje se localizaría donde convergen las terceras regiones protegidas de ambas cadenas, por ser éste el punto central. En esta región, la primera base protegida en la cadena codificante está separada por 4 pb de la primera base protegida en la cadena

complementaria (Fig. 71C), indicando que RepA está unida a una cara de la hélice del DNA a través del surco menor. Ya que, dentro de la misma cadena, las regiones protegidas más externas están a una y a dos vueltas de hélice de la región central correspondiente, podemos concluir que los contactos RepA-DNA están en la misma cara de la hélice. Una inspección de la secuencia de DNA en los alrededores de la región protegida central, pone de manifiesto la existencia de una secuencia de 13 pb con simetría rotacional binaria alrededor del par G-C central que ocupa la séptima posición (Fig. 70B). Diez de las doce bases restantes exhiben esta simetría, de forma que la secuencia de 13 pb es un palíndromo casi perfecto. Además, ambos lados del elemento simétrico presentan un palíndromo interno de 4 pb (5'-TGCA-3'), que crea una simetría interna adicional. Dentro de la región de 13 pb, el primer (de 5' a 3' sobre la cadena codificante) palíndromo interno de 4 pb pertenece a la caja -35 del promotor P_{AB} , mientras que el segundo está incluido en el sitio único ApaLI del plásmido pLS1. Aparte de esta región no hemos encontrado otras zonas con simetría dentro del área total cubierta por RepA.

Los ensayos de protección frente a DNasa I y radical hidroxilo se han realizado, también, con el fragmento de 224 pb NcoI-ApaLI del plásmido pLS1 Δ 24, marcado en su extremo ApaLI en una u otra cadena. En este caso, el patrón de bandas obtenido en presencia de la proteína es totalmente diferente al observado en todos los experimentos anteriores: aparecen, incluso a las concentraciones de represor más bajas, contactos RepA-DNA distribuidos aproximadamente cada vuelta de hélice (Fig. 72). Estos contactos se inician en una zona que corresponde, aproximadamente, a las regiones protegidas a, b, d, c' y e', detectadas en anteriores experimentos, según se visualiza en un gel de PAA al 20% (Fig. 72A y 72B). Estos contactos se extienden, de forma espectacular, a lo largo de todo el fragmento de DNA analizado (Fig. 72C). Este patrón de contactos desaparece cuando los ensayos se realizan en presencia de DNA competidor (Fig. 73; compárense las calles 1-2 y 25-26 con calles 7-20), aunque, incluso en estas condiciones, la adición de un exceso de proteína (calles 3 y 24) reproduce el patrón de contactos inespecíficos. Esto contrasta con los resultados obtenidos al usar el fragmento de 179 pb Fnu4HI-HinFI de pLS1 (Fig. 68A, calles 5 a 12). De esta forma queda claro que existe una alteración de la especificidad de los contactos de RepA con fragmentos de DNA que presentan el elemento simétrico justo en un extremo (por proceder de la digestión con ApaLI; Fig. 72B). Esto puede deberse, bien a que la digestión con ApaLI haya "separado" del fragmento secuencias implicadas en la especificidad de unión de la proteína, o bien a que la localización del sitio de unión de RepA justo en un extremo del fragmento de DNA impida un posicionamiento adecuado de la proteína en su diana. Es pertinente señalar aquí que los contactos entre TrpR y su operador, descritos por Otwinowski y cols (1988),

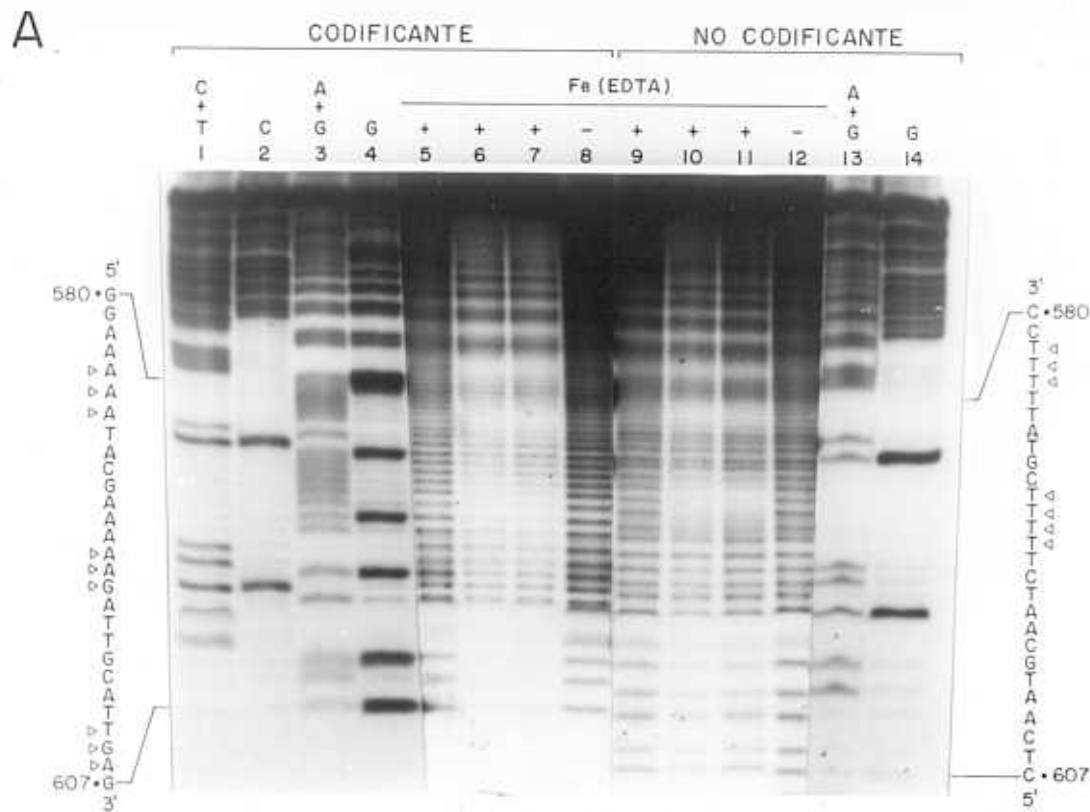
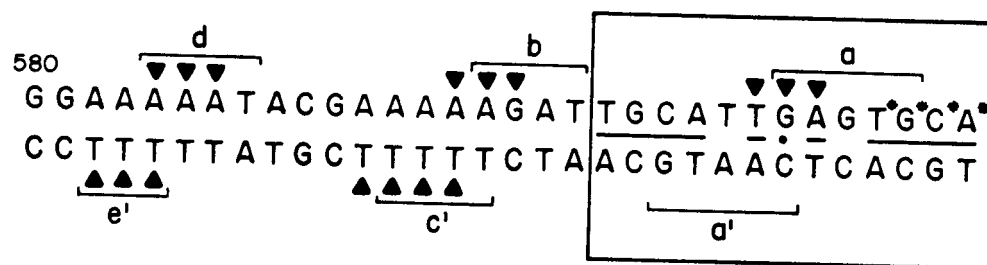
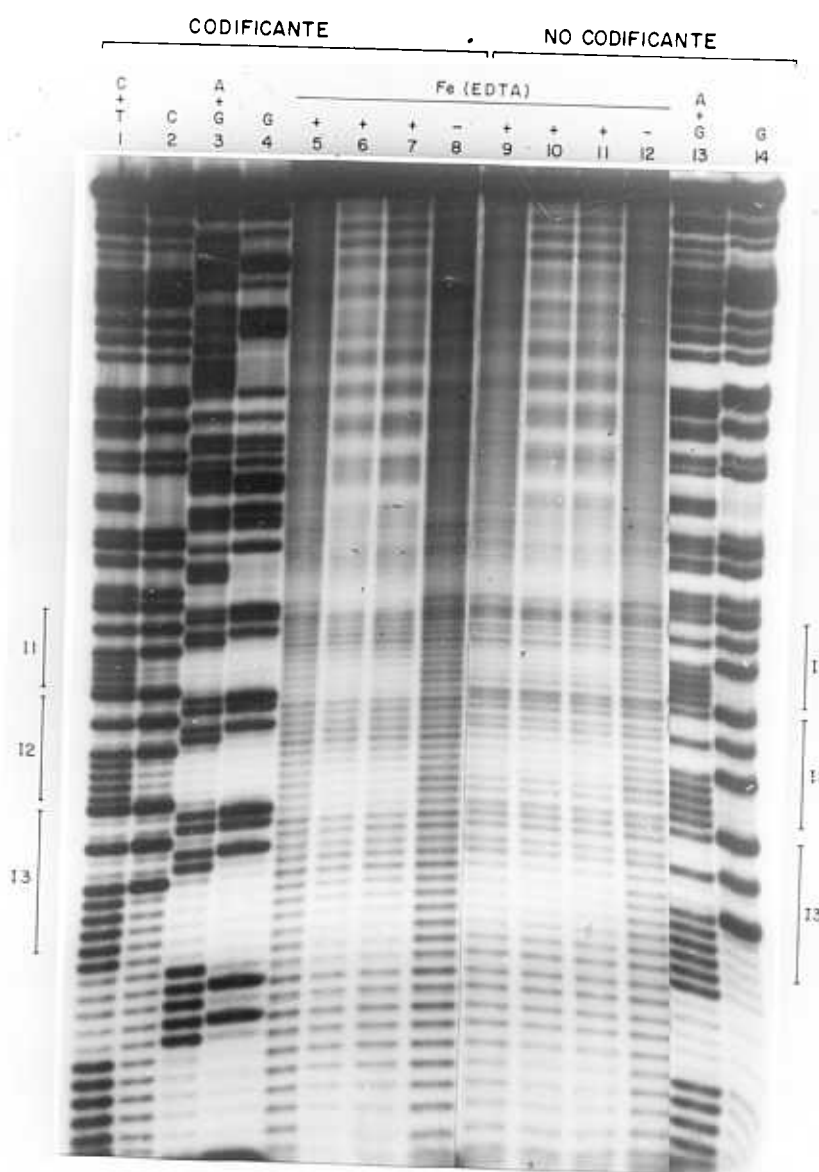


Figura 72. Efecto de RepA sobre el patrón de rotura por radical hidroxilo de las cadenas codificante y no codificante del fragmento NcoI-ApaLI (224 pb) de pLS1Δ24. A y C, productos de los ensayos de protección, analizados mediante electroforesis en geles de secuencia con PAA al 20% (A) o al 8% (C), y posterior autorradiografía. Se empleó el fragmento NcoI-ApaLI marcado, en el extremo ApaLI, en una u otra cadena (según se indica). Fe(EDTA): productos de la rotura parcial del DNA con radical hidroxilo, en ausencia de RepA (-) o en presencia (+) de 0.8 ng (calles 5 y 9), 8 ng (calles 7 y 11), y 80 ng (calles 6 y 10) de la proteína. Se incluyen también los productos de reacciones de secuencia Maxam y Gilbert del mismo fragmento, marcado en la cadena codificante (calles 1 a 4) o en la no codificante (calles 13 y 14). En A se presenta la secuencia de nucleótidos de una y otra hebra entre las coordenadas 580 y 607 (sitio de corte por ApaLI en la cadena codificante); los ▷ señalan las bases cuyas desoxirribosas aparecen protegidas del ataque por radical hidroxilo en presencia de RepA. En C se indica la posición de los tres iterones plasmídicos. B, secuencia de DNA del fragmento de 224 pb NcoI-ApaLI de pLS1Δ24 entre la coordenada 580 y el extremo generado por ApaLI. Los * indican las bases presentes sólo en el fragmento marcado en la cadena codificante (mediante relleno por Pol IK del extremo 3' recesivo). Las bases cuyas desoxirribosas aparecen protegidas por RepA del ataque del radical hidroxilo en el fragmento marcado en una u otra hebra se señalan por ▼. Las regiones a, a', b, c', d y e', protegidas por RepA frente a la rotura química en otros fragmentos sonda que no presentan un extremo ApaLI, se indican por corchetes. El elemento simétrico de 13 pb se muestra recuadrado, con las bases palindrómicas subrayadas y el eje de simetría señalado por un punto.

B



C



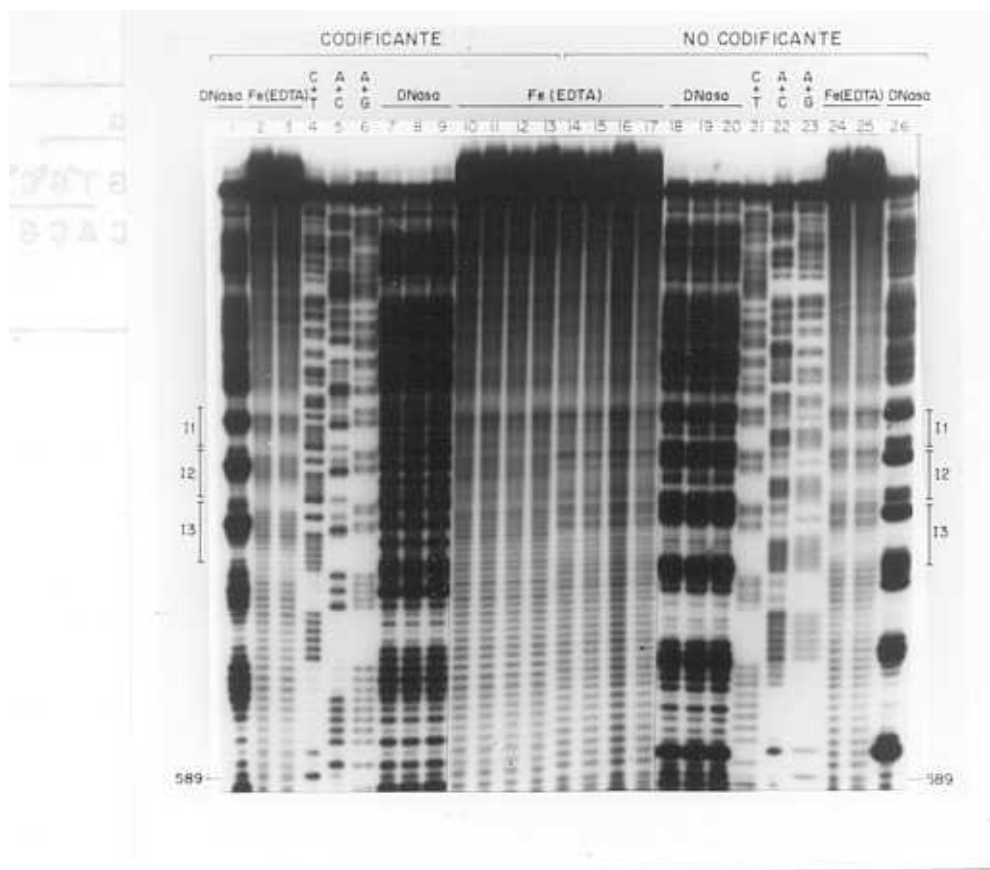


Figura 73. Efecto de la adición de DNA competidor sobre el patrón de protección por RepA frente a la rotura química o enzimática del fragmento de 224 pb NcoI-ApaLI de pLS1Δ24. Se empleó el fragmento NcoI-ApaLI (224 pb) de pLS1Δ24, marcado en el extremo ApaLI en una u otra hébra (según se indica). DNasa: productos de la digestión parcial del DNA con DNasa I. Fe(EDTA): productos de la rotura parcial del DNA con radical hidroxilo. Los ensayos se realizaron en ausencia de RepA (calles 7, 10, 11, 16, 17 y 20), o en presencia de las siguientes cantidades de la proteína: 0.8 ng (calles 9, 13, 14 y 18), 8 ng (calles 1, 2, 8, 12, 15, 19, 25 y 26), y 80 ng (calles 3 y 24). Algunos ensayos se realizaron en presencia de 0.5 μg de DNA de timo de ternera sonificado (calles 3, 7-10, 12-15, 17-20, y 24). Se muestran también los productos de reacciones de secuencia Maxam y Gilbert para el fragmento marcado en la cadena codificante (calles 4 a 6) o en la no codificante (calles 21 a 23). Para cada una de las cadenas se señalan las bandas correspondientes a la posición 589 y a los tres iterones de pLS1 (I1 a I3).

han sido considerados posteriormente como no específicos en base a que el oligonucleótido sintético empleado (19 pb) era demasiado corto para acomodar adecuadamente la proteína al DNA (Staacke y cols, 1990).

Actividad *in vivo* de RepA en su entorno fisiológico.

Como ya comentamos al principio de este apartado, la localización de la mutación *cop7* dentro del gen *repA* constituyó la primera evidencia del papel del producto de este gen en la regulación de la replicación. Por lo que hemos visto hasta ahora, dicha

regulación se ejercería a través de la unión de la proteína represora RepA a un operador que solapa con el promotor P_{AB} , inhibiéndose así la síntesis del mRNA *repAB*. La proteína mutante (RepA7) presentaría en posición 30 un residuo E, en lugar del residuo A presente en la proteína silvestre. Dado que el fenotipo exhibido por el plásmido pLS1*cop7* es el de un mayor número de copias, la alteración en la proteína mutante debe conducir a una disminución de su actividad represora. Al igual que pLS1, pLS1*cop7* se mantiene de forma estable en las células de *S.pneumoniae* en ausencia de presión selectiva, según hemos comprobado tras 60 generaciones de crecimiento exponencial en medio sin antibiótico. Durante el crecimiento de cultivos de pneumococos, hemos observado que el tiempo de duplicación de las células que contienen pLS1*cop7* es ligeramente superior al de las que contienen el plásmido silvestre, tanto en presencia como en ausencia de Tc. Este efecto puede deberse a que el mayor número de copias del plásmido pLS1*cop7* determina un incremento en la dosis del gen *tet*, cuyo producto parece ser tóxico para la bacteria cuando se encuentra en alta concentración. Por otro lado, no hemos observado diferencias significativas entre la tasa de crecimiento de pneumococos que contienen pJS3 y la de aquéllos que llevan pJS3*cop7*, aunque este último plásmido exhibe, también, un número de copias 5 veces mayor que el de tipo silvestre. Dado que pJS3 y pJS3*cop7* corresponden, básicamente, a pLS1 y pLS1*cop7* a los que se les ha reemplazado el marcador de Tc^r por el de Cm^r, las observaciones anteriores apoyarían la hipótesis de la relación entre incremento en la dosis del gen *tet* y disminución de la tasa de crecimiento celular. Esta interpretación puede ser válida, también, para explicar nuestro fracaso en el intento de transferir pLS1*cop7* a *B.subtilis* y a *E.coli*. Por el contrario, los plásmidos pJS3 y pJS3*cop7* sí pudieron ser transferidos a estas dos especies. En los tres huéspedes (*S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli*), el número de copias del plásmido mutante es unas 5 veces mayor que el del plásmido silvestre. Ya que la mutación *cop7* se expresa fenotípicamente en las tres especies bacterianas, la regulación de la replicación por RepA debe ser un mecanismo general para el control del número de copias de pLS1 en todos estos huéspedes.

Para determinar si la función de RepA resulta esencial para el plásmido, se construyeron una serie de derivados delecionados de pLS1, y las construcciones viables se seleccionaron por su capacidad para establecerse y replicar en pneumococos. Con este fin, el DNA de pLS1 se linearizó en su sitio único BglI(804), que está casi contiguo al codón de terminación de *repA* (Fig. 6), y se sometió a digestión con BAL31. Tras preparar la mezcla de ligación, ésta se utilizó para transformar un cultivo competente de *S.pneumoniae* 708. Los transformantes fueron seleccionados para Tc^r, y su contenido plasmídico se analizó mediante electroforesis en gel. El DNA de los cinco plásmidos de

TABLA 8: Deleciones en los derivados *repA*⁻

Plásmido	Coordenadas incluidas en región delecionada	Secuencia en los bordes de la deleción	Número de copias
pLS1ΔA12	653 - 804	GTGAC / TGGCA	68±4
pLS1ΔA21	655 - 805	GACGC / GGCAG	16±2
pLS1ΔA23	656 - 805	ACGCA / GGCAG	28±3
pLS1ΔA34 ^a	653 - 815 654 - 816	GTGAC / GGCTA TGACG / GCTAA	123±12
pLS1ΔA4 ^a	648 - 815 649 - 816	GAGAG / GGCTA AGAGG / GCTAA	31±4

(a) Existen dos posibilidades debido a ambigüedad en la secuencia

menor tamaño se secuenció para determinar los bordes de las deleciones. Los nombres de los derivados delecionados escogidos, y los datos más relevantes relativos a los mismos (coordenadas de la región de pLS1 incluida en las deleciones, secuencias en los bordes de las deleciones y número de copias en pneumococos) se recogen en la Tabla 8. En todos estos derivados, el gen *repA* está totalmente delecionado (Fig. 74). Los plásmidos carentes de *repA* no parecen tener disminuida su capacidad de mantenimiento en la célula huésped, ya que se heredan establemente en la población de pneumococos en ausencia de presión de selección (según hemos comprobado durante 60 generaciones de crecimiento exponencial de los cultivos en medio sin antibiótico). La estabilidad segregacional de los derivados *repA*⁻ de pLS1 constituye la diferencia principal con el fenotipo manifestado por derivados de ColE1 que carecen del gen *rop*. Efectivamente, la proteína Rop (codificada por este gen) constituye un factor secundario que regula la replicación del plásmido de alto número de copias ColE1. Rop facilita la interacción entre el ctRNA y los transcritos precursores del RNA "primer". En ausencia de esta proteína, el número de copias se hace unas cinco veces mayor y el plásmido se hereda de forma inestable (revisado por Novick, 1987). De los resultados obtenidos con los derivados *repA*⁻ de pLS1 podemos concluir que la actividad de RepA no es esencial para la replicación y mantenimiento de pLS1 en pneumococos. Por lo que respecta a los números de copias que estos derivados muestran en *S.pneumoniae* (Tabla 8), los valores obtenidos son, en algunos casos similares, y en otros superiores, al del parental pLS1. De momento desconocemos la razón por la que plásmidos que difieren en unas pocas bases presentan números de copias tan distintos.



Figura 74. Secuencia de nucleótidos de pLS1 entre las coordenadas 530 y 879, mostrando las regiones deletionadas en los derivados *repA*⁻. Se señalan: los tres iterones plasmídicos (I1 a I3); los promotores P_{AB} y P_I, con las cajas -35 y -10 en negritas; el sitio de iniciación del mRNA *repAB*; el S.D. de *repA*; las secuencias correspondientes a los codones de iniciación y terminación de la síntesis de RepA y al de iniciación de la síntesis de RepB; y las regiones deletionadas en pLS1ΔA4, pLS1ΔA12, pLS1ΔA21, pLS1ΔA23 y pLS1ΔA34 (ΔA4, ΔA12, ΔA21, ΔA23 y ΔA34, respectivamente).

De cualquier forma, debemos tener presente que estas deletiones afectan no sólo al gen *repA*, sino también a otros factores de posible importancia para la regulación de la replicación (el RNA II, la secuencia y, por consiguiente, la estructura del mRNA *repB*, y las posibles interacciones entre ambos RNAs).

Con el fin de estudiar *in vivo* el efecto del incremento de la dosis génica de *repA* sobre la replicación de pLS1, hemos realizado dos construcciones basadas en pC194*cop* (denominadas pCGA3 y pCGA3*cop7*), en las que se clonaron, respectivamente, los genes *repA* y *repA**cop7*. Para ello, los DNAs de pLS1 y pLS1*cop7* se digirieron con *Pst*I, y el fragmento de 1051 pb de uno y otro plásmido fue purificado. A continuación, este fragmento se trató con los enzimas de restricción *Alu*I y *Bgl*II. Los fragmentos originados en estas digestiones (indicando las coordenadas de sus extremos), así como las regiones de posible relevancia contenidas en cada uno de ellos, se muestran en la Tabla 9. Ya que *Bgl*II cortó sólo parcialmente, también hemos incluido en la misma Tabla el fragmento *Alu*I (505 a 921) procedente de las moléculas en las que *Bgl*II no cortó. La

TABLA 9: Clonaje de subfragmentos del fragmento PstI B de pLS1 y de pLS1cop7

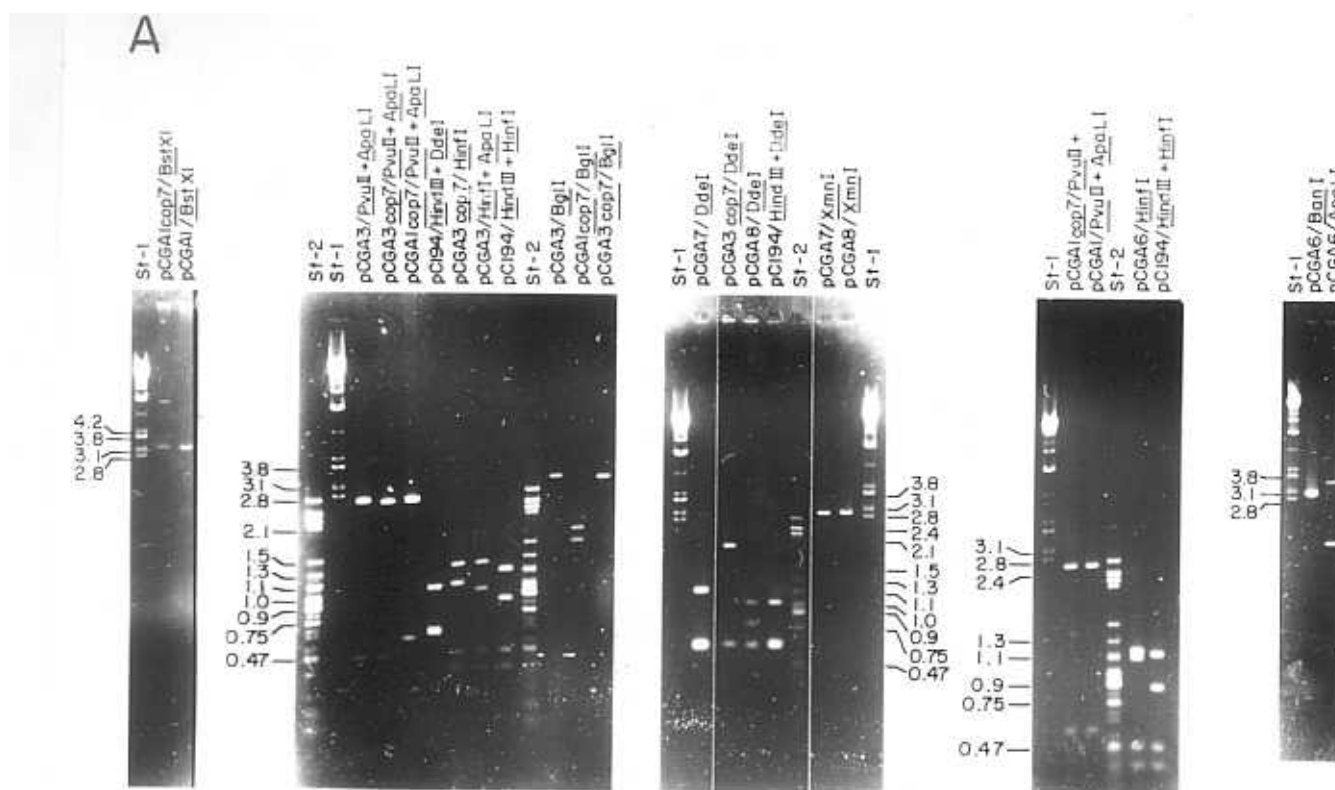
Fragmento y coordenadas de corte	Tamaño del fragmento ^a clonado (pb)	Plásmido	Regiones relevantes en fragmento clonado
<u>Pst</u> I(5)- <u>Alu</u> I(62)	57	--	--
<u>Alu</u> I(62)- <u>Alu</u> I(277)	215	pCGA6	Horquilla III y región del RNA I
<u>Alu</u> I(277)- <u>Alu</u> I(320)	43	-- ^c	--
<u>Alu</u> I(320)- <u>Alu</u> I(505)	185	pCGA7 pCGA8	Horquillas II y I (sitio rotura por RepB)
<u>Alu</u> I(505)- <u>Bgl</u> I(804)	296	pCGA3 pCGA3cop7	Iterones y <u>repA</u> Iterones y <u>repA</u> cop7
<u>Bgl</u> I(804)- <u>Alu</u> I(921)	117	--	Promotor P _{II}
<u>Alu</u> I(921)- <u>Alu</u> I(1012)	91	-- ^c	--
<u>Alu</u> I(1012)- <u>Alu</u> I(1036)	24	--	--
<u>Alu</u> I(1036)- <u>Pst</u> I(1056)	16	--	--
<u>Alu</u> I(505)- <u>Alu</u> I(921) ^b	416	pCGA1cop7	Iterones, <u>repA</u> cop7 y región que codifica el RNA II

(a) El tamaño de los fragmentos se ha corregido para los nucleótidos eliminados por digestión con S1.

(b) Fragmento parcial escapado de la digestión con BglI.

(c) Plásmidos no analizados.

mezcla de fragmentos procedentes de pLS1 o pLS1cop7 se trató con nucleasa S1 (para eliminar las extensiones protuberantes presentes en algunos de los fragmentos) y se incubó, en presencia de ligasa, con el DNA de pC194cop linearizado en su sitio único HindIII y tratado también con S1. Las dos mezclas de ligación se usaron, por separado, para transformar un cultivo competente de *S.pneumoniae* 708. Los transformantes se seleccionaron en placas con Cm, y se analizó el contenido plasmídico de 200 de los clones obtenidos (100 clones procedentes de la transformación con cada una de las mezclas). Los plásmidos que presentaban el tamaño adecuado para alguna de las construcciones de interés (Tabla 9) se mapearon mediante cortes con enzimas de restricción, para comprobar la procedencia del DNA clonado. En la Figura 75, se muestran los patrones de restricción obtenidos (panel A), y esperados (panel B) para los distintos plásmidos. Los nombres de las construcciones verificadas se indican en la Tabla 9. Como se ve, en un caso se obtuvieron las dos orientaciones posibles del fragmento clonado, en tanto que en el resto de las ocasiones sólo se consiguió una de ellas. En este apartado nos



B

Plásmido	Enzima	Fragmentos
pC194	HindIII + DdeI	1011; 636; 613; 609; 38
	HindIII + HinfI	1187; 873; 473; 374
pCGA1	BstXI	3319
o	BglI	1762; 1557
pCGA1cop7	PvuII + ApaLI	2692; 627
pCGA3	BglI	3199
o	PvuII + ApaLI	2692; 507
o	DdeI	1939; 613; 609; 38
pCGA3cop7	HinfI	1299; 1053; 473; 374
o	HinfI + ApaLI	1299; 975; 473; 374; 78
pCGA6	BanI	3118
o	HinfI	1218; 1053; 473; 374
pCGA7	XmnI	3088
o	DdeI	1190; 638; 613; 609; 38
pCGA8	XmnI	3088
o	DdeI	1017; 811; 613; 609; 38

Figura 75. Verificación de las construcciones obtenidas en el clonaje de subfragmentos del fragmento *Pst*I B de pLS1 o pLS1cop7 en el plásmido pC194cop. **A**, mapeo de restricción, con los enzimas indicados, de las construcciones asignadas como pCGA1 o pCGA1cop7, pCGA3 o pCGA3cop7, pCGA6, pCGA7, y pCGA8 (véase Tabla 9). Los fragmentos de restricción se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y tinción con EtBr. Como referencia, se corrieron también los productos de las digestiones del DNA de pC194cop con los enzimas indicados. St-1 y St-2: DNA del fago T7 digerido, respectivamente, con *Mbo*I y *Hpa*II; el tamaño de los fragmentos se indica en los márgenes. **B**, tabla con los patrones de restricción esperados para cada una de las construcciones.

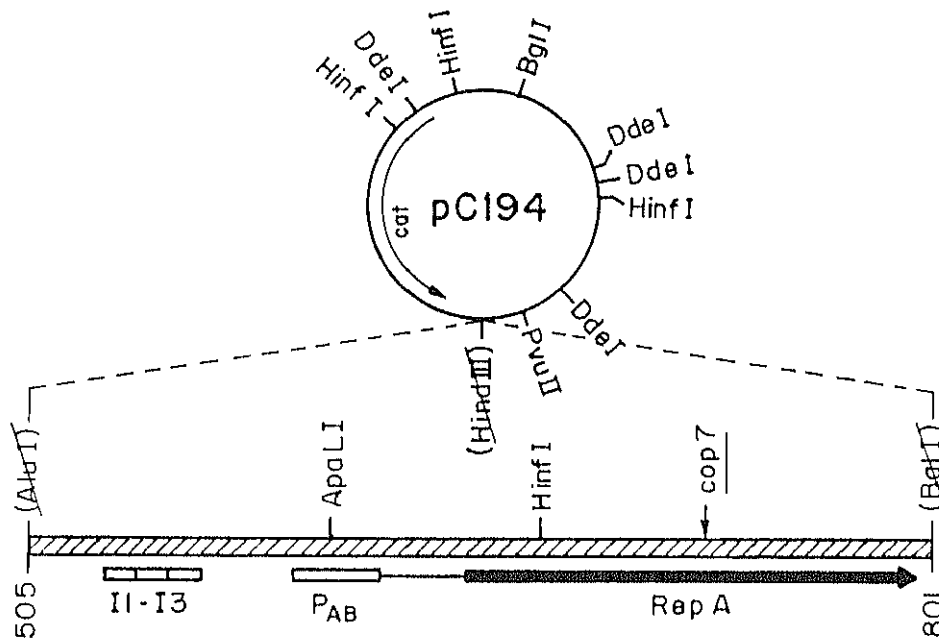


Figura 76. Mapa de pCGA3 y pCGA3*cop7*. Se presenta el mapa físico circular de pC194 y, en su sitio único *Hind*III, se muestra el inserto procedente del DNA de pLS1 o de pLS1*cop7* (en rayado). Nótese que la representación de vector e inserto se ha realizado a distinta escala. La orientación relativa del fragmento clonado con respecto al vector queda indicada. Sólo se presentan los sitios de restricción más relevantes. Los sitios de restricción tachados se perdieron en el clonaje del fragmento *Alu*I(505)-*Bgl*II(804) de pLS1 (nótese que el tratamiento con S1 eliminó los nucleótidos 802 a 804). Dentro del fragmento clonado se muestra la posición relativa de los tres iterones plasmídicos (II a I3), el promotor P_{AB} y el gen que codifica RepA. La localización de la mutación *cop7* también se señala.

centraremos en el clonaje de *repA* y *repA**cop7* (plásmidos pCGA3 y pCGA3*cop7*, respectivamente). Los mapas de restricción de las construcciones restantes y la orientación relativa de los fragmentos clonados en ellas se mostrarán en un apartado posterior.

Los plásmidos pCGA3 y pCGA3*cop7* llevan, pues, clonado un fragmento que comprende las coordenadas 505 a 801 de la secuencia de pLS1. Este fragmento contiene las tres repeticiones directas del *ori*(+) y el gen *repA* (*wt* o *cop7*, respectivamente). La orientación del fragmento clonado relativa al vector, y los sitios de restricción más relevantes se indican en la Figura 76. El efecto de la presencia de pCGA3 o pCGA3*cop7* sobre la replicación tanto de pLS1 como de pLS1*cop7* se analizó mediante la realización de dos tipos de tests de incompatibilidad (Test I y Test II; apartado 6 de Métodos). En el Test I, pCGA3 o pCGA3*cop7* se transfirieron, mediante transformación, a células competentes de pneumococos que contenían pLS1 o pLS1*cop7* (Fig. 77A). En el Test II, células competentes de *S.pneumoniae* que contenían pCGA3 o pCGA3*cop7* fueron transformadas con el DNA de pLS1 o de pLS1*cop7* (Fig. 77B). Los transformantes se aislaron en placas, siendo seleccionados, en ambos tipos de Tests, para el marcador del

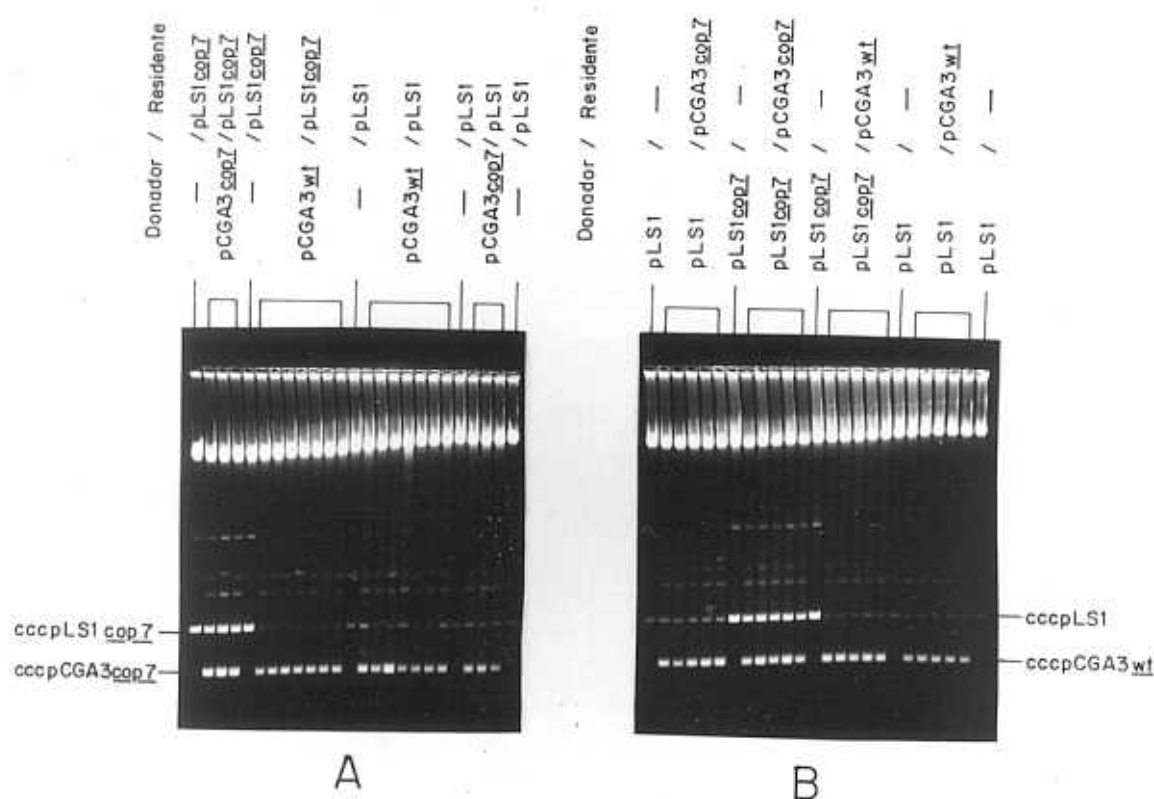


Figura 77. Efecto *in trans* del incremento en la dosis génica de *repA* sobre el número de copias de pLS1. El análisis se realizó mediante Tests de incompatibilidad de tipo I (A) y de tipo II (B). *Pneumococos* conteniendo los plásmidos residentes señalados se transformaron con los DNAs plasmídicos donadores que se indican, aplicándose la selección para el plásmido entrante. El contenido plasmídico de varios clones transformantes se analizó por preparación de extractos crudos, electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y tinción con EtBr. Como control, se realizó el mismo análisis en las estirpes homoplasmídicas correspondientes a pLS1 y pLS1_{cop7} (- en Donador o Residente). Se señala la posición del cccDNA de las formas monoméricas superenrolladas de los replicones pLS1 y pC194. Obsérvese la gran cantidad de multímeros en las estirpes que llevan plásmidos derivados de pC194. (pCGA3_{wt} = pCGA3).

plásmido donador (Cm^r o Tc^r, respectivamente). Varias colonias de tamaño mediano se inocularon en medio líquido con el antibiótico correspondiente y, una vez crecidos los cultivos, se analizó su contenido total de DNA. Según nuestros cálculos (apartado 6 de Métodos), en el momento de realizar este análisis han transcurrido unas 37 generaciones en ausencia de selección para el marcador del plásmido residente. Los resultados de estos ensayos de complementación se pueden resumir del siguiente modo (Fig. 77): cuando la proteína RepA de tipo silvestre es suplementada *in trans*, el número de copias del plásmido pLS1 no se altera de forma significativa, pero el del mutante pLS1_{cop7} se ve severamente reducido. Ya que las transformaciones realizadas en estos experimentos se llevaron a cabo en una estirpe no defectiva en recombinación, era importante descartar que el efecto de disminución en el número de copias de pLS1_{cop7} se debiera a una

alteración permanente de su DNA por recombinación interplasmídica. Para ello, el DNA correspondiente a las formas monoméricas superenrolladas ccc de pLS1*cop7* presentes en la estirpe heteroplasmídica (con pCGA3 y pLS1*cop7*), se extrajo del gel y se utilizó para transformar la estirpe sin plásmido. El DNA total de doce de los transformantes obtenidos se analizó, comprobándose que el fenotipo *cop7* queda totalmente restaurado en la estirpe homoplasmídica (estos resultados no se muestran). Contrariamente a lo observado en presencia de pCGA3, la proteína mutante RepA7 no produce ningún efecto en *trans* ni sobre el número de copias de pLS1 ni sobre el de pLS1*cop7* (Fig. 77). Como se mostrará en el próximo apartado, la presencia del plásmido pC194*cop* (del que derivan pCGA3 y pCGA3*cop7*) tampoco provoca efecto alguno sobre el número de copias de los plásmidos silvestre o mutante. De todos estos resultados se concluye que RepA actúa *in vivo* como un modulador del número de copias de pLS1, y que esta actividad se encuentra disminuida en la proteína RepA7. La capacidad de RepA para actuar en *trans* es otra de las conclusiones que se desprende de estos ensayos. Además, tal y como cabe esperar para una alteración que afecta a un inhibidor, la mutación *cop7* es recesiva, pudiendo ser complementada por el gen silvestre presente en *trans*.

7. CONTROL PRIMARIO DE LA REPLICACION: EL PAPEL DEL RNA II.

Caracterización del RNA II mediante ensayos de transcripción *in vitro*.

Entre las coordenadas 843 y 871 de la secuencia de pLS1 existe una región, a la que hemos denominado P_{II}, con homología a la consensu de promotores (Fig. 74). La transcripción a partir del promotor P_{II} daría lugar a un ctRNA (RNA II), que sería sintetizado en sentido contrario al del mRNA *repAB*. Para conocer si la región P_{II} se comporta realmente como un promotor capaz de dirigir la síntesis del RNA II, y para determinar la longitud aproximada de este transcrito, hemos realizado una serie de ensayos de transcripción *in vitro* utilizando la RNA polimerasa de *E.coli*. Con el fin de asignar inequívocamente el transcrito correspondiente al RNA II, utilizamos como DNA molde una serie de fragmentos procedentes de pLS1, pLS5*cop11* o pCGA3. El tamaño y procedencia de los fragmentos empleados, así como la localización en ellos del promotor P_{AB} y de la región P_{II} se indican en la Figura 78D. En los ensayos realizados tomando como molde el fragmento de 842 pb BanI-PstI de pLS1, se sintetizan, además del transcrito "run-off" procedente del promotor P_{AB} y de los artefactos comentados con

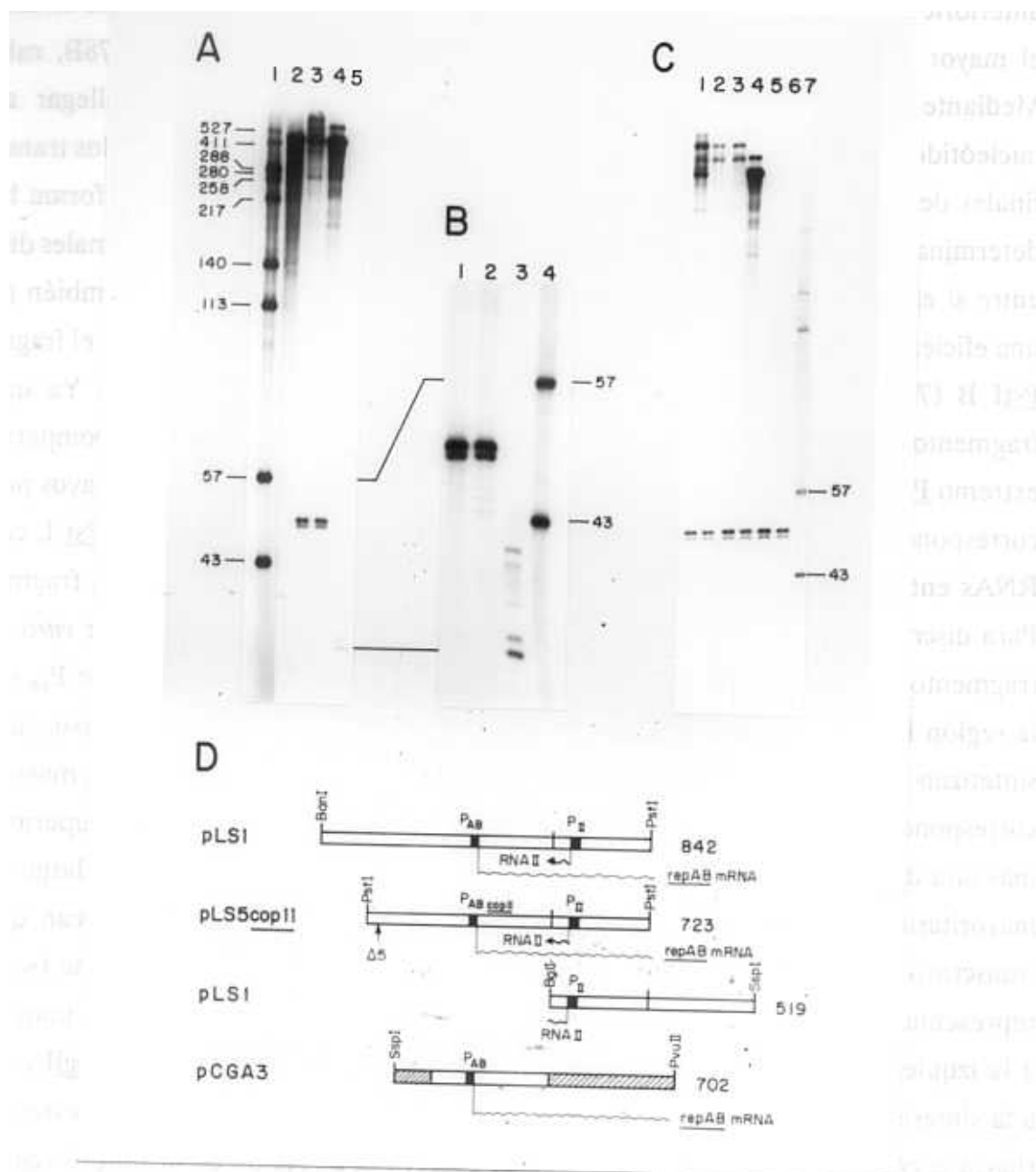


Figura 78. Transcripción *in vitro* desde el promotor P_{II} . **A**, transcritos sintetizados a partir de los siguientes DNAs: fragmento de 702 pb $SspI$ - $PvuII$ de pCGA3 (calle 2); fragmento $PstI$ B (723 pb) de pLS5cop11 (calle 3); fragmento de 842 pb $BanI$ - $PstI$ de pLS1 (calle 4); y fragmento de 519 pb $BglI$ - $SspI$ de pLS1 (calle 5). Como marcadores de referencia se usaron los fragmentos $DdeI$ de pLS1 Δ A12 marcados radiativamente (calle 1); el tamaño de estos fragmentos se indica a la izquierda. **B**, detalle de la parte inferior del autorradiograma correspondiente a las calles 3-5 del panel A. Se utilizaron como molde los fragmentos: $PstI$ B de pLS5cop11 (calle 1); $BanI$ - $PstI$ de pLS1 (calle 2); y $BglI$ - $SspI$ de pLS1 (calle 3). La exposición autorradiográfica se realizó durante largo tiempo para incrementar la detección de las tenues bandas en la calle 3 (correspondiente a la calle 5 en el panel A). Calle 4: fragmentos $DdeI$ de pLS1 Δ A12 marcados radiativamente; el tamaño de los fragmentos de referencia se indica a la derecha. **C**, transcripción *in vitro* a partir del promotor P_{II} en presencia de concentraciones de RepA que inhiben la actividad del promotor P_{AB} . Se emplearon, como molde, los fragmentos $PstI$ B de pLS5cop11 (calles 1-3), y $BanI$ - $PstI$ de pLS1 (calles 4-6). Los ensayos se realizaron en ausencia de RepA (calles 1 y 4) o en presencia de 50 ng (calles 2 y 5) y 100 ng (calles 3 y 6) de la proteína. Como marcadores de referencia se usaron los fragmentos $DdeI$ de pLS1 Δ A12 marcados radiativamente; el tamaño de dos de estos fragmentos, relevantes para la caracterización del RNA II, se indica a la derecha. **D**, mapas de los fragmentos usados en estos ensayos, con el tamaño (pb) indicado a la derecha. Se muestra la posición relativa de los promotores P_{AB} / $P_{ABcop11}$ y P_{II} . Los RNAs esperados se representan como líneas onduladas, que, en el caso de los transcritos "run-off", no acaban en flecha. Se indica, sobre el fragmento $PstI$ B de pLS5cop11, la localización de la región delecionada en este plásmido ($\Delta 5$). En el fragmento $SspI$ - $PvuII$ de pCGA3, las regiones correspondientes al DNA de pC194 se presentan rayadas.

anterioridad (Fig. 65), dos pequeños transcritos (de unos 50 nts) muy similares en tamaño, el mayor de los cuales es el más abundante (Fig. 78A, calle 4, y Fig. 78B, calle 2). Mediante exposiciones autorradiográficas muy prolongadas se puede llegar a ver, nucleótido a nucleótido, toda la escalera de intermediarios en la síntesis de los transcritos finales de unos 50 nts (estos autorradiogramas no se muestran). De esta forma hemos determinado que los dos pequeños transcritos visualizados como productos finales difieren entre sí en un solo nucleótido. Estos dos pequeños RNAs se sintetizan también (y con una eficiencia similar a la del ensayo anterior) cuando se utiliza como molde el fragmento PstI B (723 pb) de pLS5cop11 (Fig. 78A, calle 3, y Fig. 78B, calle 1). Ya que los fragmentos de DNA empleados como molde en los dos ensayos anteriores comparten un extremo PstI (Fig. 78D), los RNAs de unos 50 nts observados en ambos ensayos podrían corresponder tanto a transcritos "run-off" iniciados a unos 50 nts del sitio Pst I, como a RNAs enteros iniciados y terminados dentro de la región común a ambos fragmentos. Para discriminar entre una y otra posibilidad, ensayamos la transcripción *in vitro* con el fragmento BglI-SspI de pLS1 (519 pb). Este fragmento carece del promotor P_{AB} y tiene la región P_{II} muy próxima al extremo BglI del mismo (Fig. 78D). En este caso, ya no se sintetizan los dos transcritos de unos 50 nts, y en su lugar aparece una banda mayoritaria correspondiente a un RNA de unos 30 nts, acompañada de varias bandas superiores, la más alta de las cuales correspondería a un transcrito siete nucleótidos más largo que el mayoritario (Fig. 78A, calle 5, y Fig. 78B, calle 3). Estos resultados indican que los transcritos de unos 50 nts se iniciarían, aproximadamente, 30 nts a la derecha (según se representa en los esquemas de la Fig. 78D) del sitio BglI(804) y terminarían unos 20 nts a la izquierda del mismo, de forma que la digestión del DNA molde con BglI conduce a la síntesis de un transcrito "run-off" más pequeño. El sitio de iniciación de estos RNAs (hacia la coordenada 834 de la secuencia de pLS1) y la dirección de su síntesis (contraria a la del mRNA *repAB*), concuerdan con lo esperado para la transcripción a partir del promotor P_{II}. Así, podemos concluir que los dos transcritos de unos 50 nts sintetizados *in vitro* corresponden realmente al RNA II. Hay que tener en cuenta que cuando se utiliza como molde el fragmento BglI-SspI de pLS1, el extremo 3'-protuberante BglI puede dar lugar a artefactos en la transcripción. Por esta razón, hemos considerado que, en estos ensayos, el transcrito mayoritario de unos 30 nts es el que corresponde realmente al "run-off" terminado en el sitio de corte BglI, en tanto que los transcritos de mayor tamaño podrían corresponder a artefactos. El hecho de que al utilizar como molde el fragmento BglI-SspI de pLS1 no aparezca el patrón observado para el RNA II entero (un transcrito mayoritario un nucleótido más largo que un segundo transcrito), sugiere que los dos transcritos detectados para el RNA II corresponderían a dos sitios de terminación consecutivos. Puesto que el transcrito mayoritario del RNA II es 17 nts más largo que

el "run-off" que finaliza en el sitio de corte BglI, la síntesis *in vitro* del RNA II debe terminar hacia la coordenada 787 de pLS1. La secuencia de DNA en los alrededores de esta posición es tal que el extremo 3' del RNA II presentaría una larga serie de Us precedida por una repetición inversa de 8 bases que podría dar lugar a una estructura secundaria de tipo tallo-lazo (Fig. 79). El extremo 3' del RNA II reúne, pues, las características típicas de un terminador independiente de rho. Aplicando el algoritmo desarrollado por d'Aubenton-Carafa y cols (1990), el valor *d* calculado para el putativo terminador del RNA II es de +59.6, con lo que se predice una eficiencia de terminación mayor del 90%. Estos valores están entre los más altos de los 148 terminadores transcripcionales computados por estos autores. Mediante análisis con ordenador de plegamiento de secuencias, no hemos encontrado en el RNA II otras estructuras secundarias aparte de la correspondiente a este terminador.



Figura 79. Secuencia de DNA en la región que codifica el RNA II, y estructura secundaria predicha para éste. Se muestra la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas entre las coordenadas 781 y 876 de pLS1. Las cajas -35 y -10 del promotor P_{11} se presentan en negritas. El mRNA *repAB* y el RNA II (sintetizados en sentidos opuestos) se representan como líneas onduladas. También se indica el propuesto a.r.b.s. de *repB*, y las secuencias correspondientes al codón de terminación de la síntesis de RepA (TAA en 790) y al de iniciación de la síntesis de RepB (ATG en 853). Debajo se muestra la secuencia propuesta para el RNA II, y su posible estructura secundaria generada por ordenador.

Los ensayos de transcripción *in vitro* utilizando el fragmento de 702 pb SspI-PvuII de pCGA3 (que contiene el promotor P_{AB} , pero no el promotor P_{II} ; Fig. 78D), confirmaron que los pequeños transcritos observados en los experimentos anteriores corresponden al RNA II sintetizado a partir del promotor P_{II} . Así, al analizar los RNAs sintetizados en estos ensayos, se observa únicamente el transcrito "run-off" de 480 nts originado a partir del promotor P_{AB} (Fig. 78A, calle 2).

Finalmente, en una serie de ensayos llevados a cabo con los fragmentos BanI-PstI (842 pb) de pLS1, o PstI B (723 pb) de pLS5*cop11* (Fig. 78D), hemos estudiado la acción de RepA sobre la síntesis *in vitro* del RNA II. Tanto en uno como en otro caso, la formación de los dos transcritos correspondientes a este RNA no se ve inhibida por la presencia de RepA, incluso a concentraciones de la proteína que bloquean totalmente la transcripción a partir de los promotores P_{AB} o $P_{ABcop11}$ (Fig. 78C). De hecho, se observa un ligero incremento en la cantidad de RNA II sintetizado en presencia de RepA, efecto que podría deberse a la inhibición del promotor $P_{AB}/P_{ABcop11}$. De esta forma, los ensayos de transcripción *in vitro* permiten descartar la regulación de la síntesis del RNA II por RepA.

Elementos del replicón pLS1 que expresan incompatibilidad.

Como ha quedado implícito en apartados anteriores, el plásmido pC194*cop* es capaz de establecerse y replicar en pneumococos (Ballester y cols, 1990). Ya que el DNA de este plásmido no presenta homología significativa con el de pLS1 en las regiones implicadas en la replicación plasmídica y su posible control, era de esperar que ambos replicones pertenecieran a grupos de incompatibilidad distintos. Para comprobarlo, realizamos un Test de tipo I, en el que el DNA de pC194*cop* se usó para transformar células de pneumococos que llevaban pLS1. El contenido en DNA total de una serie de clones transformantes se analizó tras unas 37 generaciones de crecimiento con selección para Cm^r . La presencia de pC194*cop* no altera en absoluto el número de copias ni la herencia estable de pLS1 (véase Fig. 81). Cuando se realiza el Test recíproco (tipo II), de forma que células que llevan pC194*cop* se transforman con DNA de pLS1, se obtienen resultados similares a los anteriores: tras unas 37 generaciones de crecimiento en presencia de Tc no hay alteración en el número de copias de ninguno de los dos plásmidos, y pC194*cop* continúa siendo heredado de forma estable en la estirpe heteroplasmídica (estos resultados no se muestran). Según se desprende de estas

observaciones, los replicones de pLS1 y de pC194 son compatibles y, por lo tanto, pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad. En estos Tests (tanto de tipo I como de tipo II), hemos encontrado, a veces, que una pequeña fracción de los transformantes ha perdido el plásmido residente (pLS1 o pC194, respectivamente). Este tipo de fenómeno, denominado desalojamiento, ya se había observado, anteriormente, en tests de desplazamiento con plásmidos compatibles en otras especies bacterianas (Novick, 1987). Aunque el mecanismo del desalojamiento continúa siendo un misterio (R. Novick, comunicación personal), este fenómeno parece producirse, exclusivamente, durante el establecimiento del plásmido entrante y, a diferencia de lo que ocurre en la incompatibilidad, la estirpe heteroplasmídica es estable y mantiene para cada plásmido un número de copias similar al de la estirpe homoplasmídica correspondiente.

Por las características que acabamos de exponer (capacidad para establecerse y replicar en *S. pneumoniae*, y compatibilidad con pLS1), pC194*cop* ha sido escogido como vector para el clonaje de fragmentos de pLS1 que contuvieran elementos presuntamente implicados en funciones de mantenimiento o control de la replicación. El efecto que produce la presencia de estos elementos sobre la replicación y estabilidad de pLS1 ha sido analizado mediante Tests de incompatibilidad de tipo I. En el apartado anterior hemos visto que las construcciones que llevan clonado el gen *repA* o *repAcop7* (pCGA3 o pCGA3*cop7*, respectivamente) pueden coexistir establemente con pLS1 (Fig. 77A). Por otra parte, en la Tabla 9 se recogen una serie de derivados de pC194*cop* que se obtuvieron, al igual que pCGA3 y pCGA3*cop7*, del clonaje de subfragmentos del fragmento PstI B de pLS1 o pLS1*cop7*. Los mapas físicos indicando la orientación relativa de los fragmentos clonados en estas construcciones y en otras que, como veremos más adelante, derivan de ellas, se muestran en la Figura 80.

Según se desprende de los estudios comparados de incompatibilidad (Novick, 1987), en los plásmidos con sistema de control inhibidor-diana, tanto directa como indirectamente regulados (véase Introducción), el contratranscrito constituye un determinante principal de incompatibilidad. En el plásmido pLS1, el RNA II es un contratranscrito del mRNA *repAB* (Fig. 79), por lo que parecía interesante analizar el efecto de un aumento de su concentración sobre la replicación de pLS1. Un primer estudio de este efecto se ha llevado a cabo utilizando la construcción denominada pCGA1*cop7*, que contiene los tres iterones del *ori*(+), el gen *repAcop7* y la región que codifica el RNA II (Tabla 9 y Fig. 80). Una vez realizado el Test de incompatibilidad de tipo I, el análisis del contenido en DNA total de 12 clones transformantes evidenció la pérdida del plásmido residente pLS1 (Fig. 81A). Mediante recuento en placa hemos

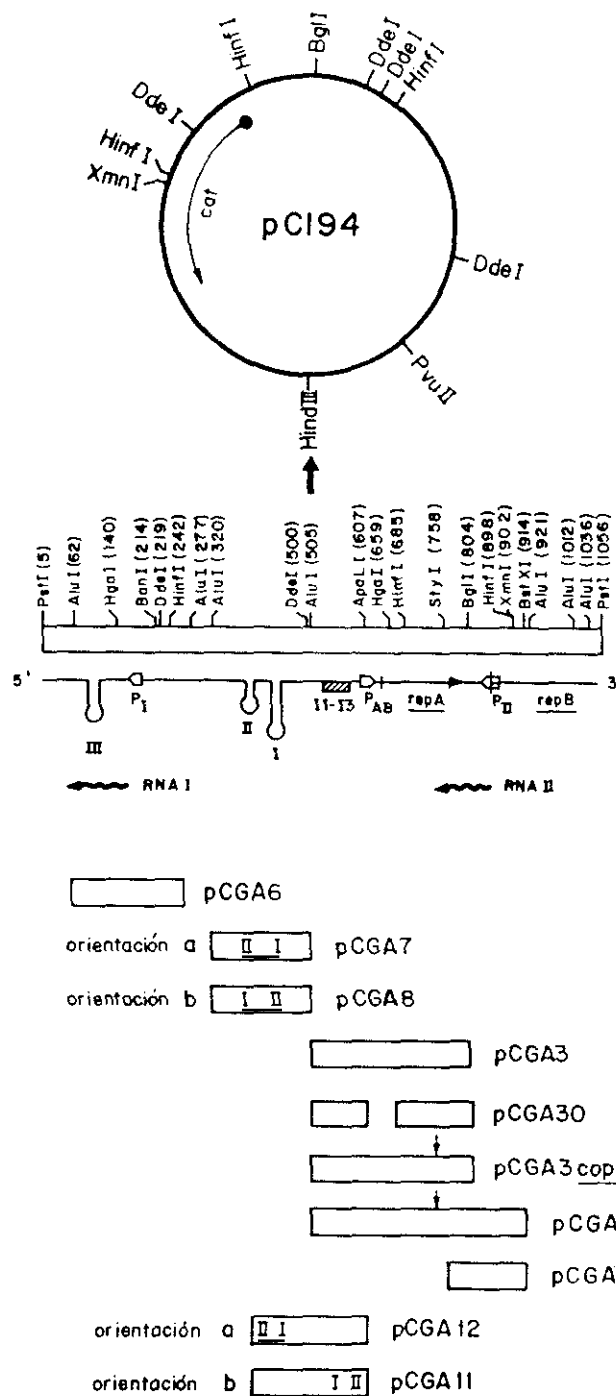


Figura 80. Mapas físicos y funcionales de las construcciones utilizadas para analizar los elementos de pLS1 que expresan incompatibilidad. Se muestran (a distinta escala) el mapa circular de pC194*cop* y el mapa de la región de pLS1 (fragmento *PstI* B) que incluye todos los fragmentos clonados. Sólo se indican los sitios de restricción más relevantes. Todos los clonajes se realizaron en el sitio *HindIII* único de pC194*cop* (señalado por una flecha). Debajo del mapa físico del fragmento *PstI* B de pLS1 se muestra la posición relativa de las horquillas I-III, los tres iterones del plásmido (I1-I3), los promotores P_{AB} y P_{II} , y los genes *repA* y *repB*. También se indican el RNA II y el putativo RNA I. Los nombres de las distintas construcciones, junto con el fragmento de pLS1 clonado en ellas se presenta, a la misma escala, más abajo. En pCGA7 y pCGA8, el mismo fragmento clonado presenta orientaciones inversas. Lo mismo sucede con pCGA11 y pCGA12. pCGA7 y pCGA12 por un lado, y pCGA8 y pCGA11 por otro, presentan la misma orientación relativa de las horquillas I y II con respecto a pC194. La localización de la mutación *cop7* en pCGA3*cop7* y pCGA1*cop7* se indica por una flecha.

determinado que, en el momento de analizar su contenido en DNA (tras 37 generaciones de crecimiento en presencia de Cm), estos clones presentaban de un 1% a un 8% de células Tc^r. Este bajo porcentaje de células con pLS1 indica la existencia de un fuerte determinante de incompatibilidad en pCGA1*cop7*. Dicho determinante estaría asociado a la región que codifica el RNA II, ya que el plásmido pCGA3*cop7* (que contiene también los iterones y el gen *repA**cop7*, pero no la región correspondiente al contratranscrito) no produce ningún efecto sobre la replicación de pLS1 (Fig. 81A).

Se ha establecido, para plásmidos con sistema inhibidor-diana regulados indirectamente (como pT181), que el origen de replicación es un segundo determinante principal de incompatibilidad (Novick, 1987). Por otra parte, para todos los plásmidos conocidos cuya regulación implica la unión de la proteína iniciadora de la replicación a secuencias directamente repetidas, el determinante primario de incompatibilidad es la región que contiene los iterones (Novick, 1987). En el DNA del plásmido pLS1 existen dos elementos implicados directamente en la iniciación de la replicación: los tres iterones a los que se une la proteína RepB, y la horquilla I, donde se produce la rotura de la cadena codificante mediada por la proteína iniciadora (de la Campa y cols, 1990). Era interesante, pues, comprobar si estos elementos, ya fuera juntos o por separado, constituían determinantes de incompatibilidad frente a pLS1. Como hemos visto anteriormente, el plásmido pCGA3 lleva clonados los iterones del *ori*(+) y el gen *repA*. Para analizar el efecto debido exclusivamente a las repeticiones directas, evitando cualquier interferencia derivada de la presencia de *repA*, este gen se inactivó por eliminación del fragmento pequeño ApaLI-HgaI de pCGA3 (coordenadas 607 a 659 sobre la secuencia de pLS1; Fig. 80). El nuevo plásmido así construido, denominado pCGA30, carece, por lo tanto, de la caja -10 del promotor P_{AB}, del S.D. para *repA* y del ATG de iniciación de este gen. Los resultados del Test de incompatibilidad demuestran que en la estirpe heteroplasmídica no se produce ni disminución del número de copias ni desestabilización de pLS1 por la presencia de pCGA30, tras 37 generaciones de crecimiento en ausencia de presión selectiva para el plásmido residente (Fig. 81A). Tampoco hemos observado la aparición de células libres de pLS1 tras 60 generaciones más de crecimiento en las condiciones anteriores (no se muestra). Así pues, en pLS1, la región a la que se une la proteína iniciadora de la replicación no constituye un determinante de incompatibilidad. Por lo que respecta a las horquillas I y II del *ori*(+), el fragmento AluI de 185 pb que las contiene ha sido clonado en las dos orientaciones posibles relativas al vector pC194 (plásmidos pCGA7 y pCGA8; Fig. 80). De nuevo, pLS1 es totalmente compatible con cualquiera de estas construcciones, y su número de copias no se ve afectado en la estirpe heteroplasmídica (Fig. 81A). Estos resultados indican que

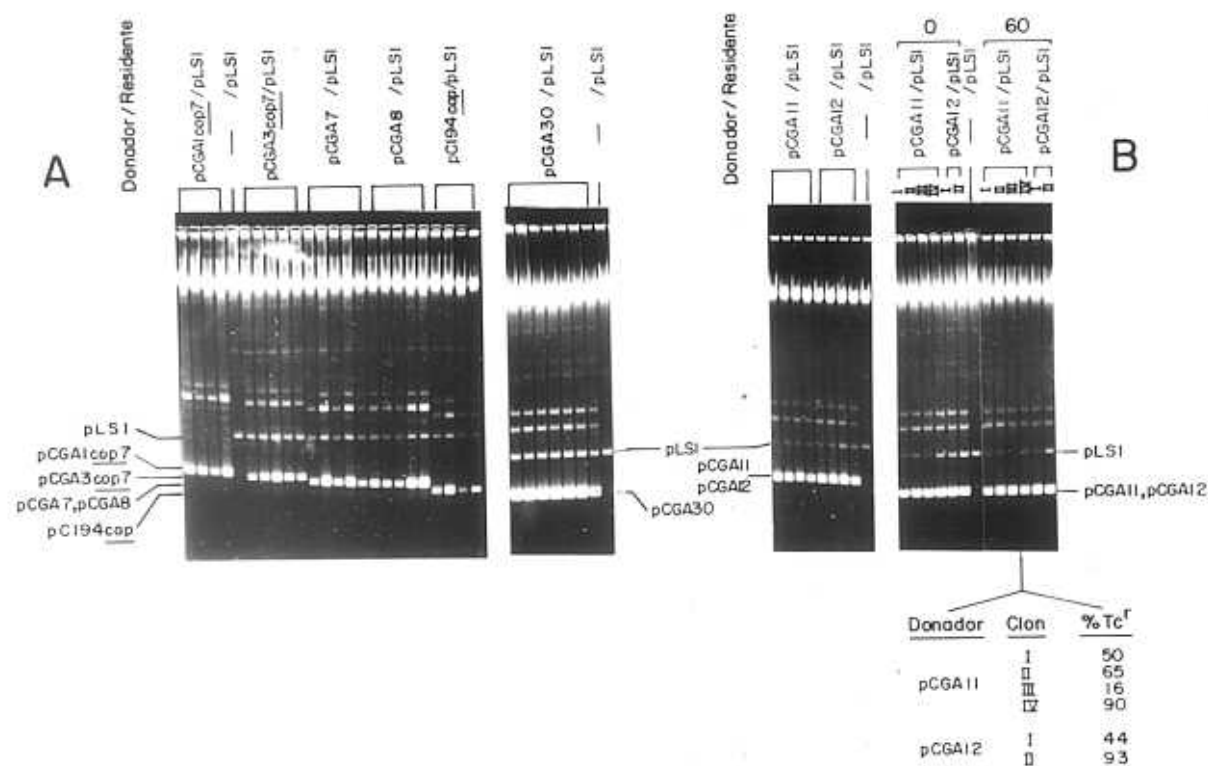


Figura 81. Efecto en *trans* de distintos elementos contenidos en el fragmento *Pst*I B de pLS1 sobre el número de copias y la estabilidad de herencia de dicho plásmido. Se realizaron Tests de incompatibilidad de tipo I, en los que células de pneumococos conteniendo pLS1 fueron transformadas con el DNA de las construcciones indicadas. Los elementos de pLS1 contenidos en los distintos plásmidos donadores se muestran en la Figura 80. Los transformantes fueron seleccionados para el marcador del plásmido donador. El DNA total de los clones transformantes se analizó mediante preparación de extractos crudos, electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, y tinción con EtBr. Como control, se analizó el DNA total de la estirpe homoplasmídica con pLS1. Las posiciones correspondientes a las formas monoméricas superenrolladas de los distintos plásmidos se señalan a los lados. En el panel A se muestra el análisis (tras 37 generaciones de crecimiento en Cm) del DNA de varios de los clones obtenidos en las transformaciones indicadas. En el panel B se presenta el análisis de los clones obtenidos en la transformación con DNA de pCGA11 y pCGA12. El contenido en DNA de los clones fue analizado tras 37 generaciones de crecimiento en presencia de Cm (gel de la izquierda). Además, varios clones (indicados con números romanos; gel de la derecha) obtenidos en cada una de estas transformaciones fueron analizados en cuanto a su contenido en DNA, bien tras 37 generaciones de crecimiento en Cm (g = 0), o bien tras el subcultivo durante 60 generaciones más en presencia de este antibiótico (g = 60). Tras este período (unas 97 generaciones de crecimiento en Cm), se determinó el porcentaje de células Tc^r para cada uno de los clones. Los resultados se muestran en la tabla bajo el gel correspondiente.

el sitio de iniciación de la síntesis de la cadena líder tampoco constituye, por sí solo, un determinante de incompatibilidad. Faltaba, pues, comprobar el efecto de un origen intacto (conteniendo los iterones y las repeticiones inversas que formarían las horquillas I y II) sobre el número de copias y la estabilidad de herencia de pLS1. Para ello, el fragmento de 224 pb NcoI-ApaI de pLS1 Δ 24 (afectado por la delección del plásmido, y conteniendo el *ori*(+) intacto) se clonó, en las dos orientaciones posibles, en el sitio HindIII de pC194*cop* (plásmidos pCGA11 y pCGA12; Fig. 80). La realización de Tests de incompatibilidad de tipo I empleando estos plásmidos como donadores mostró que, tras 37 generaciones de crecimiento en ausencia de Tc, existía sólo un débil efecto tanto de pCGA11 como de pCGA12 sobre el número de copias de pLS1 (Fig. 81B). Para revelar más claramente el efecto de uno y otro plásmido sobre la estabilidad de pLS1, algunos de los clones inicialmente heteroplasmídicos se crecieron 60 generaciones más sin presión selectiva para el plásmido residente. El análisis del porcentaje de células Tc^r en estos clones (Tabla en Fig. 81B) muestra que, como término medio, un 40% de las células habían perdido el plásmido residente después de un total de unas 100 generaciones en ausencia de Tc. Estos resultados evidencian que el *ori*(+) de pLS1 clonado expresa una ligera incompatibilidad (independiente de la orientación), que podría explicarse en términos de titulación de la proteína RepB activa en *trans*. Ya que el clonaje de los iterones (pCGA30) no produce un efecto similar, la unión de RepB al *ori*(+) intacto (en pCGA11 o pCGA12) tendría unas características distintas a las de la unión a sólo los iterones. Así, cuando están presentes los iterones y la horquilla I, podría producirse una interacción más fuerte (secuestro) de la proteína, o una utilización con inactivación de la misma; en suma, un "gasto" de RepB. Sin embargo, el origen intacto clonado en pC194*cop* (en una u otra orientación) no parece ser activable por RepB suministrada en *trans* por pLS1, como se deduce de la imposibilidad de obtener plásmidos viables tras la eliminación de las funciones de replicación de pC194. Esto significaría que si RepB está siendo realmente utilizada por el *ori*(+) clonado, la frecuencia de iniciación en dicho origen sería insuficiente para responder por sí misma del mantenimiento del plásmido recombinante.

Como vimos al principio de este trabajo, el plásmido pLS5 está afectado por una delección de 332 pb que le confiere un número de copias mayor que el de pLS1. La región delecionada incluye la repetición inversa de 16 pb (capaz de formar la horquilla III) y la información necesaria para la síntesis del putativo RNA I. Por lo tanto, alguno de estos elementos (o los dos) podría desempeñar, *in vivo*, un papel en la regulación de la replicación de pLS1. El plásmido pCGA6 lleva clonados ambos elementos de pLS1 (Fig. 80) y, al igual que las construcciones anteriores, se ha utilizado como donador en Tests

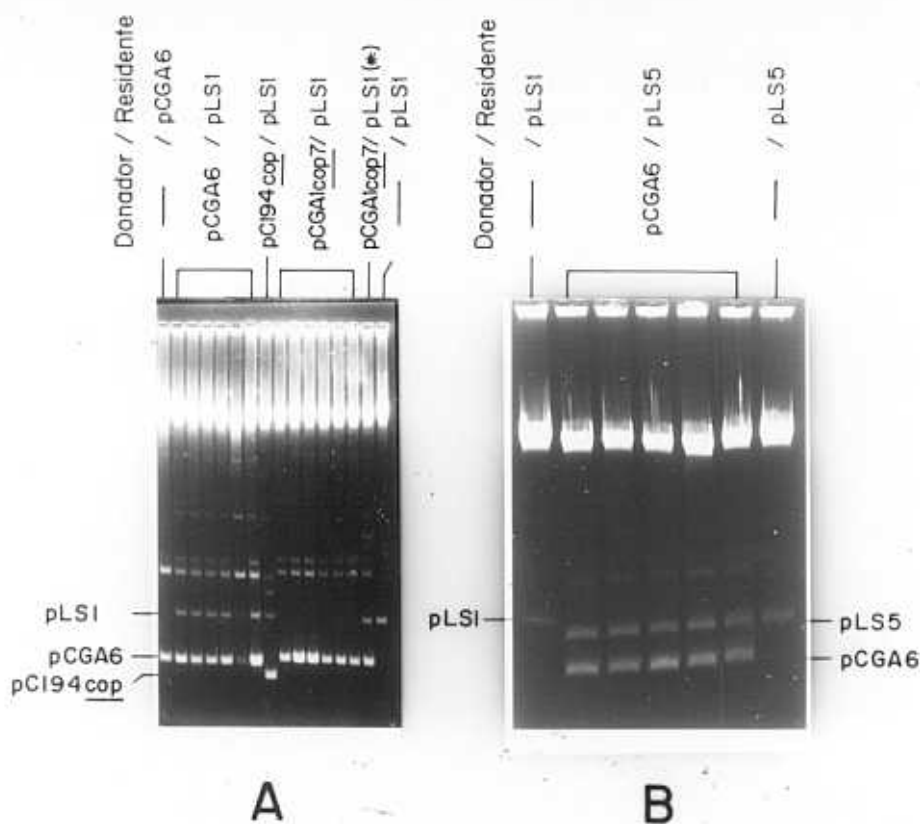


Figura 82. Efecto *in trans* de la región que determina la horquilla III y el putativo RNA I sobre el número de copias de pLS1 y pLS5. Se realizaron Tests de incompatibilidad de tipo I, en los que el DNA de pCGA6 (fragmento *AluI*(62)-*AluI*(277) de pLS1 clonado en pC194cop, véase Tabla 9) se utilizó para transformar células de pneumococos que contenían pLS1 (A) o pLS5 (B) como plásmido residente. La selección se realizó, en todos los casos, para el plásmido donador. El contenido en DNA total de varios de los clones transformantes obtenidos se analizó mediante la preparación de extractos crudos, electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y tinción con EtBr. Obsérvese que en uno de los clones analizados en el panel A se ha producido una ligera degradación del DNA, que conduce a un incremento en las formas OC paralelo a una disminución en las formas superenrolladas de ambos plásmidos. Como control, se analizó el DNA total de estirpes homoplasmídicas con pCGA6, pLS1 o pLS5. En el panel A se muestra, asimismo, el DNA contenido en un clon procedente de la transformación de células de pneumococos conteniendo pLS1, con DNA de pC194cop (selección para el plásmido donador). También se incluye el análisis del DNA presente en seis clones procedentes de la transformación, con DNA de pCGA1cop7, de células de pneumococos que llevaban pLS1 (selección para el plásmido donador). La calle marcada (*) en este mismo panel, muestra el DNA presente en un clon procedente de la anterior transformación, pero seleccionado para los plásmidos donador y residente. Las posiciones correspondientes a las formas monoméricas superenrolladas de los distintos plásmidos se señalan a los lados, en los paneles A y B. Nótese que la posición de estas formas correspondientes a pCGA1cop7 (no indicada) es sólo ligeramente más alta que la de pCGA6.

de incompatibilidad de tipo I. En este caso no se observa efecto alguno sobre la replicación o estabilidad de pLS1 (Fig. 82A). Estos resultados podrían indicar que el elemento regulador del que carece pLS5 actúa sólo en *cis*. Alternativamente, esta regulación podría estar a "tope" en pLS1, ya que este plásmido presenta intacta la región que estamos considerando. Cuando se realiza el Test I en pneumococos que contienen pLS5 como plásmido residente, éste tampoco es desestabilizado por la presencia de pCGA6. Además, pLS5 conserva en la estirpe heteroplasmídica el mismo número de copias que presenta en la homoplasmídica (Fig. 82B). La incapacidad para corregir en *trans* el defecto regulador de pLS5 podría deberse, bien a que la delección en este plásmido afecta tanto a un inhibidor como a su diana de acción, o bien a que la región delecionada presenta elementos reguladores activos sólo en *cis*. Aunque aún no conocemos el mecanismo de acción de esta regulación de la que carece pLS5, en la Discusión analizaremos algunas hipótesis junto con los datos experimentales que las apoyan o debilitan.

Como resumen de los resultados obtenidos en los tests de desplazamiento analizados hasta aquí, podemos decir que existe un determinante de incompatibilidad primario y otro secundario para el plásmido pLS1. El determinante que expresa una débil incompatibilidad es el *ori*(+) completo colocado en *trans*, que ejercería su efecto por titulación del iniciador RepB activo en *trans*. Esto, unido a que la mutación *cop7* conduce a un incremento concomitante del mensajero de *repB* y del número de copias plasmídico, sugiere que la concentración de la proteína iniciadora es limitante de velocidad para la replicación. El segundo determinante de incompatibilidad (y el más importante por sus implicaciones en la autocorrección natural del número de copias plasmídico) es la región que codifica el RNA II. Como se observa en la Figura 79, la síntesis del RNA II ocurre en sentido opuesto a la del mRNA *repAB*, por lo que ambos transcritos son complementarios en la región de solapamiento, y podrían interaccionar por apareamiento de bases. Este tipo de interacción entre el mensajero para la proteína iniciadora de la replicación y un ctRNA constituye, precisamente, la base del mecanismo de control de la replicación empleado por muchos de los plásmidos con sistema de regulación inhibidor-diana (Novick, 1987; véase en la Introducción). En el caso del plásmido pLS1 podría ocurrir también un mecanismo de este tipo, de forma que el apareamiento de bases entre las regiones complementarias del mRNA *repAB* (diana de acción del inhibidor) y del ctRNA II (inhibidor) bloqueara la síntesis de RepB. Esto explicaría la fuerte incompatibilidad causada por el clonaje de la región que codifica el RNA II. Los experimentos de incompatibilidad indican también que, de acuerdo con las exigencias del modelo, el RNA II es un inhibidor difusible capaz de actuar en *trans*. Además, hay que

tener en cuenta que la desestabilización de pLS1 por la presencia de pCGA1*cop7* se produce aun cuando este plásmido lleva clonada la región que determina tanto el inhibidor como su putativa diana de acción (Fig. 80). Así, el mecanismo de acción en el que está implicado el RNA II sería capaz de responder a fluctuaciones en el número de copias plasmídico. Estas observaciones contrastan con los resultados obtenidos en los tests de incompatibilidad con pCGA3, plásmido que contiene tanto el gen que codifica el inhibidor RepA como la diana de acción de esta proteína (el operador del promotor P_{AB}). En este caso, y debido probablemente a la capacidad de autorregulación de RepA, no se produce la desestabilización de pLS1 (Fig. 77). De esta forma, el ctRNA II podría ser considerado como el elemento primario del control de la replicación y, por tanto, del número de copias de pLS1.

Puesto que en los experimentos anteriores se observa una pérdida muy rápida de pLS1 en presencia de pCGA1*cop7*, se puede concebir que una forma de obtener mutantes en la región de control del primero de estos plásmidos (bien sea en el fragmento clonado o bien en el replicón pLS1) es forzar la coexistencia de ambos mediante selección para los dos marcadores plasmídicos. Por esta razón, una vez realizada la transformación correspondiente al Test I (con DNA donador de pCGA1*cop7*), los transformantes se seleccionaron y crecieron en presencia de Tc y Cm. A modo de control, estos ensayos se realizaron también utilizando como donador DNA de pCGA3*cop7* (plásmido que no determina incompatibilidad frente a pLS1) y aplicando la doble selección. Empleando concentraciones iguales de los DNAs donadores, el número de transformantes Tc^r Cm^r obtenidos para pCGA1*cop7* fue, aproximadamente, el 30% de los conseguidos con pCGA3*cop7*, y el desarrollo de las colonias transformantes fue mucho más lento en el primer caso. El contenido en DNA total de algunos de los clones seleccionados en cada una de estas transformaciones se analizó mediante preparación de extractos crudos y electroforesis en gel de agarosa (Fig. 83). Los nueve clones analizados procedentes de la transformación con pCGA3*cop7* presentan tanto este plásmido como pLS1 en su forma individualizada, sin que se observe la presencia de ningún otro plásmido. Además, el número de copias de pLS1 en estos clones es similar al observado en la estirpe homoplasmídica. Por otra parte, de los doce clones analizados procedentes de la transformación con pCGA1*cop7*, dos presentan un plásmido mayoritario que, por su tamaño, podría corresponder a un cointegrado entre pLS1 y pCGA1*cop7*; en ocho de ellos se observa el cointegrado acompañado de los plásmidos pLS1 y pCGA1*cop7*; y, finalmente, en otros dos clones aparecen ambos plásmidos en ausencia del cointegrado. En estos dos últimos clones, el número de copias de pLS1 es significativamente menor que el observado en la estirpe homoplasmídica correspondiente. Sin embargo, ni en estos clones ni en los

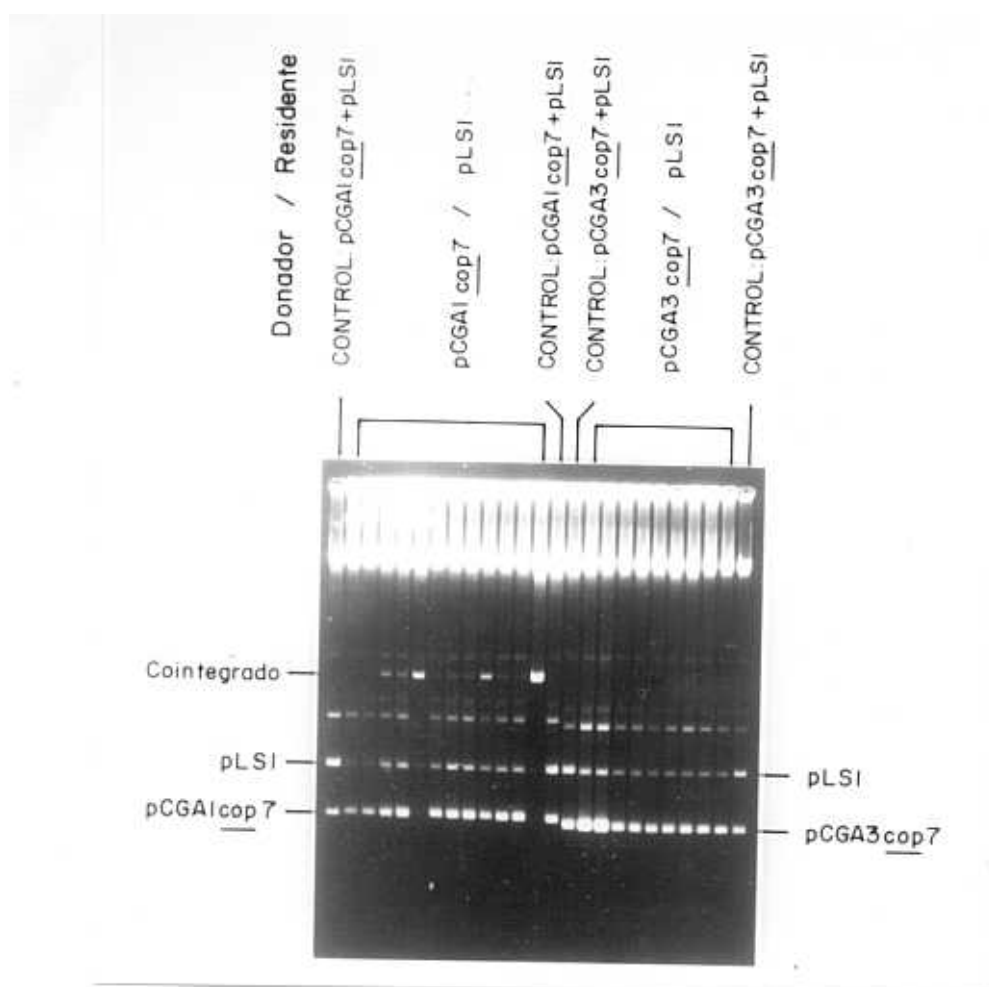


Figura 83. Corresidencia obligada, por selección, de pLS1 con plásmidos que llevan el determinante del RNA II clonado. Células de pneumococos conteniendo pLS1 fueron transformadas con pCGA3cop7 o pCGA1cop7 (fragmentos *AluI*(505)-*BglI*(804), y *AluI*(505)-*AluI*(921) de pLS1cop7, respectivamente, clonados en pC194cop). El DNA de varios clones transformantes, seleccionados para los marcadores de los plásmidos donador y residente, se analizó por preparación de extractos crudos, electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con EtBr. CONTROLES: 0.5 µg de DNA puro de pLS1 añadidos a una muestra de extracto crudo preparado a partir de células que contenían pCGA1cop7 o pCGA3cop7 (según se indica). A los lados se muestra la posición de las formas monoméricas superenrolladas de pLS1, pCGA3cop7, pCGA1cop7, así como las del cointegrado entre pLS1 y pCGA1cop7.

que presentan el cointegrado se produce ya (tras unas 37 generaciones de crecimiento en presencia de Tc+Cm) la pérdida del marcador de resistencia de pLS1 cuando se elimina la selección para dicho marcador (no se muestra). El diferente comportamiento seguido por pCGA1cop7 y pCGA3cop7 tras su entrada en las células de pneumococos que contienen pLS1 parece indicar que la formación de cointegrados es un mecanismo eficiente (y que podría producirse con elevada frecuencia) para contrarrestar, al menos inicialmente, la fuerte inhibición de la replicación de pLS1 causada por la presencia de pCGA1cop7. Así, el cointegrado podría replicar a través de las funciones del replicón pC194, sobre las que no tendría efecto el determinante de incompatibilidad clonado. Después, podrían seleccionarse mutaciones que afectaran al elemento regulador de pLS1,

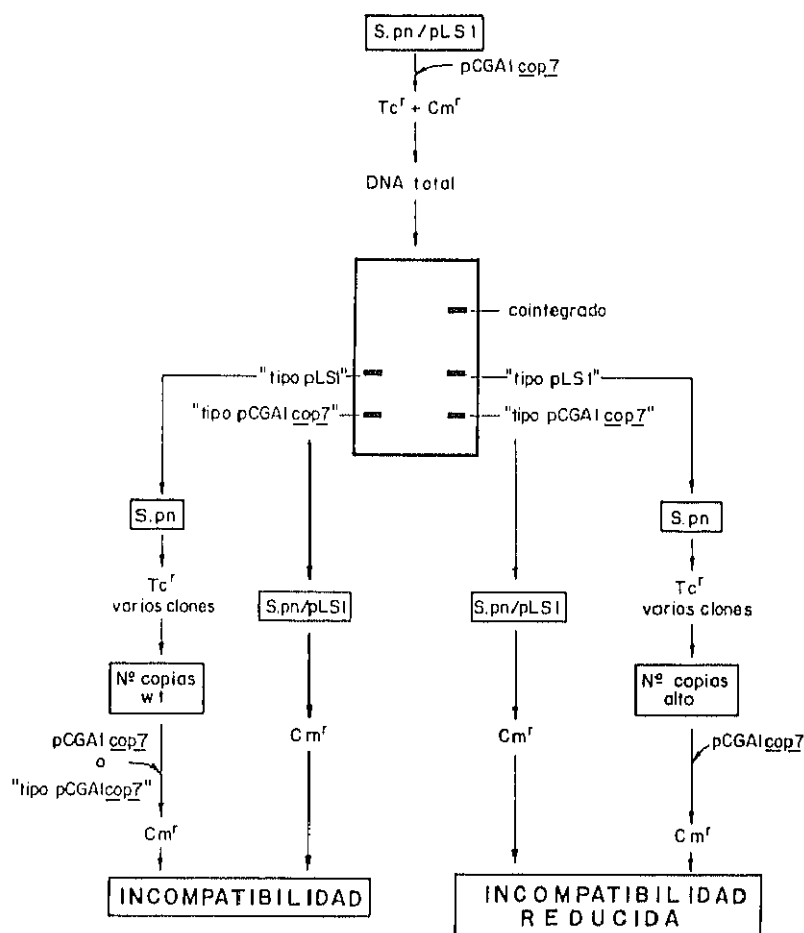


Figura 84. Esquema para el análisis del fenotipo de incompatibilidad de plásmidos basados en pLS1 o pCGA1cop7, obligados a coresidir en células sometidas a doble selección. Células de pneumococos (S.pn) conteniendo pLS1 se transformaron con DNA de pCGA1cop7. En varios de los clones obtenidos por selección para Tc^r + Cm^r se analizó el contenido en DNA total (Fig. 83). En dos de los clones, el DNA de las formas monoméricas superenrolladas de los plásmidos señalados se eluyó del gel y se empleó como donador en las transformaciones que se indican.

de forma que el cointegrado pudiera resolverse, dando lugar a dos plásmidos capaces ya de coexistir. La capacidad de los plásmidos individualizados correspondientes a los replicones de pC194 (plásmido "tipo pCGA1cop7") o de pLS1 (plásmido "tipo pLS1") para producir o sufrir desplazamiento, respectivamente, se ha analizado en dos de los clones procedentes de la transformación con pCGA1cop7 y seleccionados para Tc^r + Cm^r (uno de los que no presentan cointegrado y otro de los que presentan el cointegrado y los dos plásmidos; Fig. 83; véase esquema en Fig. 84). Para ello, las formas monoméricas superenrolladas de los dos plásmidos se eluyeron por separado del gel y se utilizaron para transformar, o bien células de pneumococos libres de plásmido (en el caso del DNA correspondiente al replicón pLS1), o bien células que contenían pLS1 (con el DNA correspondiente al replicón pC194). A su vez, se prepararon cultivos competentes de varios de los clones obtenidos en la transformación con el DNA monomérico

correspondiente a los plásmidos "tipo pLS1" y se transformaron con pCGA1*cop7*. En las transformaciones con DNA donador "tipo pCGA1*cop7*", los transformantes se seleccionaron siempre para Cm^r (marcador del plásmido donador), con el fin de poner de manifiesto la posible pérdida del plásmido endógeno (se trata, pues, de Tests de incompatibilidad de tipo I). Los resultados obtenidos en cuanto a la localización de la posible mutación que atenúa o anula el efecto de incompatibilidad fueron distintos para los dos clones analizados (Fig. 84). En el caso del clon que no presentaba cointegrado en el momento del análisis, no hemos podido localizar la mutación en ninguno de los dos plásmidos: el plásmido "tipo pLS1" presenta un fenotipo *wt* con respecto al número de copias en la estirpe homoplasmídica y es eliminado de la población por la presencia de pCGA1*cop7*, en tanto que el plásmido "tipo pCGA1*cop7*" es capaz, a su vez, de determinar incompatibilidad frente a pLS1. También se produce la pérdida de pLS1 cuando se intenta la combinación plasmídica original mediante retransformación de las células que contienen el plásmido "tipo pLS1" con DNA del plásmido "tipo pCGA1*cop7*" (no se muestra). En todos estos ensayos de incompatibilidad, los clones transformantes, analizados tras 37 generaciones de crecimiento en Cm, presentan un porcentaje de células Tc^r similar al encontrado en los experimentos de desplazamiento de pLS1 por pCGA1*cop7* (entre un 1% y un 8% de las células viables). Así pues, parece que en este clon la coexistencia estable de pLS1 y pCGA1*cop7* sería determinada por una mutación en el cromosoma de la célula huésped. En el segundo clon analizado (el que presentaba restos del cointegrado en el momento del análisis), hemos encontrado mutaciones que determinan una disminución de la incompatibilidad, tanto en el plásmido "tipo pLS1" como en el de "tipo pCGA1*cop7*" (Fig. 84). El plásmido "tipo pLS1" exhibe un fenotipo de alto número de copias en la estirpe homoplasmídica y, aunque la presencia de pCGA1*cop7* disminuye su número de copias aproximadamente a los niveles de pLS1, no se detecta la aparición de segregantes homoplasmídicos que lleven pCGA1*cop7*. Igualmente, el plásmido "tipo pCGA1*cop7*" aislado de este clon disminuye el número de copias de pLS1 (estos resultados no se muestran), pero tiene reducida su capacidad para desestabilizar a pLS1: tras 37 generaciones de crecimiento de la estirpe inicialmente heteroplasmídica en presencia de Cm, entre un 60% y un 90% de las células todavía conservan el plásmido pLS1. Aunque estas mutaciones no se han caracterizado todavía, pensamos que su conocimiento ayudará a comprender el mecanismo de acción y los requerimientos del elemento primario del control replicativo de pLS1.

Por otra parte, puesto que los resultados de los ensayos de transcripción *in vitro* indican que el RNA II termina alrededor de la coordenada 787 de la secuencia de pLS1, el fragmento StyI(758)-AluI(921) de este plásmido (sin promotor P_{AB} ni gen *repA*, pero

con toda la información necesaria para codificar el RNA II) debería constituir, al ser clonado, un determinante de incompatibilidad frente a pLS1. Para confirmarlo, construimos el plásmido pCGA9 (fragmento de 163 pb StyI-AluI de pLS1 clonado en el sitio único HindIII de pC194cop; Fig. 80), y analizamos el efecto de su presencia sobre el número de copias y la estabilidad de pLS1. El plásmido pCGA9 se construyó, en dos pasos, a partir de pCGA1cop7 y pC194cop (Fig. 85). En un primer paso, se realizó la ligación del fragmento StyI A (2324 pb) de pCGA1cop7 con el fragmento pequeño StyI-HindIII (743 pb) de pC194cop. Durante este proceso, y debido a la ambigüedad de la secuencia de reconocimiento por StyI (5'-C'C(A/T)(A/T)GG-3'), sólo se pueden anillar

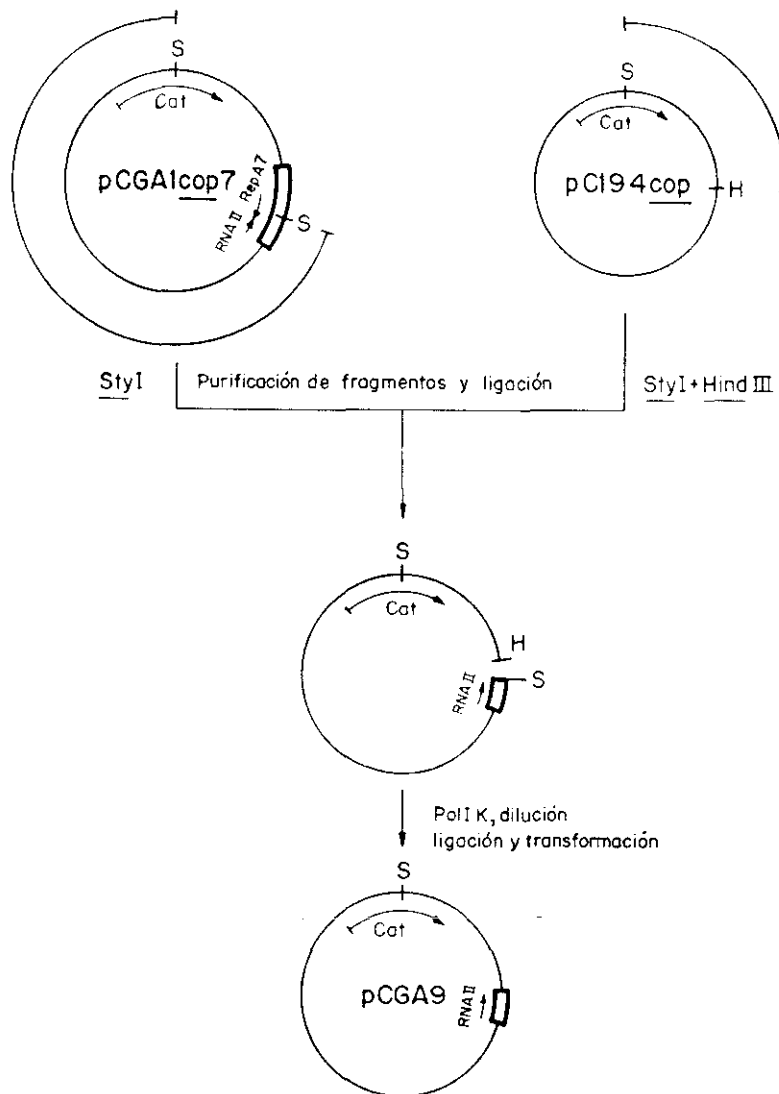


Figura 85. Estrategia utilizada para el subclonaje de la región que codifica el RNA II. El plásmido pCGA9 (fragmento StyI(758)-AluI(921) de pLS1 clonado en pC194cop) se construyó por unión del fragmento StyI A de pCGA1cop7 con el fragmento StyI-HindIII pequeño de pC194cop, tal y como se recoge en el esquema. Las regiones correspondientes al DNA del replicón pLS1 se representan por una barra vacía (▬). Se indica la posición y orientación de los genes que codifican los productos Cat, RepA7 y RNA II. Sitios de restricción: S, StyI; H, HindIII.

los extremos que regeneran el sitio StyI localizado en el DNA de pC194. A continuación, los extremos no anillados StyI (correspondiente a pLS1) y HindIII (correspondiente a pC194) se rellenaron mediante tratamiento con Pol IK. Seguidamente, se realizó una segunda etapa de ligación en condiciones que favorecieran la recircularización de las moléculas. La construcción obtenida se analizó en *S.pneumoniae*, comprobándose que se trataba del plásmido pCGA9 (Fig. 85).

El efecto producido sobre la estabilidad de pLS1 por un incremento de la dosis del RNA II se evidenció mediante Tests de incompatibilidad de tipo I, en los que se utilizó pCGA9 como plásmido donador. El análisis del contenido total de DNA en 7 de los clones transformantes obtenidos muestra que, tras 37 generaciones en ausencia de selección para el marcador de pLS1, este plásmido (que era el residente en un principio) ha desaparecido casi por completo de la población, y ya no se observa (Fig. 86). Estos resultados confirman que la región clonada, con toda la información para la síntesis del RNA II, constituye un fuerte determinante de incompatibilidad vectorial frente a pLS1.

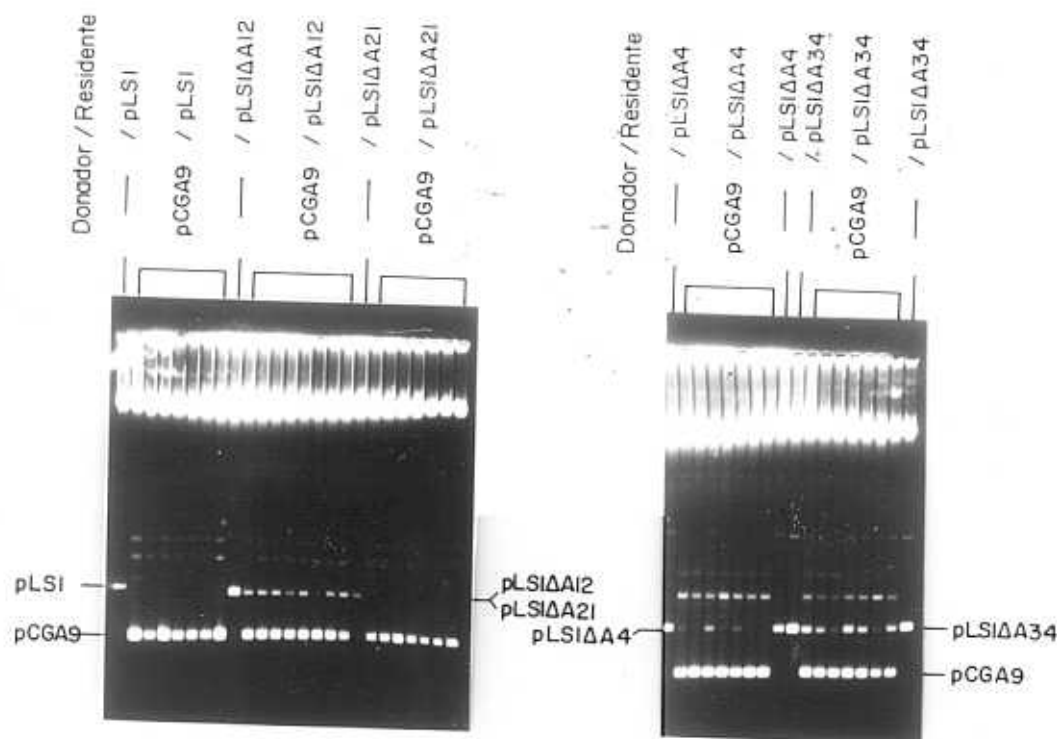


Figura 86. Efecto *in trans* del determinante del RNA II sobre pLS1 y sus derivados *repA'*. Se realizaron Tests de incompatibilidad de tipo I, en los que células de pneumococos conteniendo pLS1 o los derivados *repA'* que se indican, fueron transformadas con DNA de pCGA9. En varios de los clones transformantes, seleccionados sólo para el marcador del plásmido donador, el DNA se analizó mediante preparación de extractos crudos, electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, y tinción con EtBr. Como controles de número de copias, se incluyen muestras de extractos crudos preparados a partir de las estirpes homoplasmídicas correspondientes. La posición de las formas monoméricas superenrolladas de los distintos plásmidos se indica a los lados.

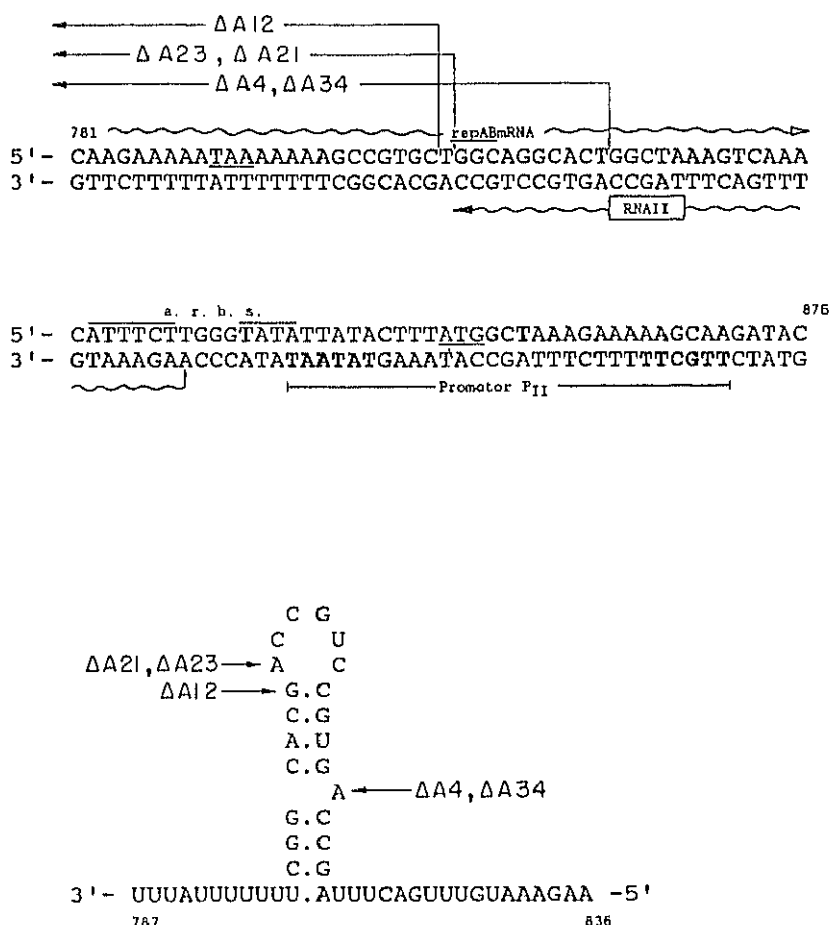


Figura 87. Secuencia de nucleótidos de la región que determina el RNA II, y localización de las partes de esta región deletionadas en los derivados *repA*⁻ de pLS1. Arriba se muestra la secuencia de DNA de ambas cadenas entre las coordenadas 781 y 876 de pLS1. Las cajas -35 y -10 del promotor P_{II} se presentan en negritas. El mRNA *repAB* y el RNA II se presentan como líneas onduladas. Se indica el supuesto a.r.b.s de *repB* y las secuencias correspondientes al codón de terminación de la síntesis de RepA (TAA en 790) y al de iniciación de la síntesis de RepB (ATG en 853). También se muestra el borde derecho de las deletiones en pLS1 $\Delta A4$, pLS1 $\Delta A12$, pLS1 $\Delta A21$, pLS1 $\Delta A23$ y pLS1 $\Delta A34$ ($\Delta A4$, $\Delta A12$, $\Delta A21$, $\Delta A23$ y $\Delta A34$, respectivamente). En los casos de ambigüedad en la determinación de la región deletionada (pLS1 $\Delta A4$ y pLS1 $\Delta A34$; Tabla 8), se ha considerado aquí la que queda más distal con respecto al promotor P_{II} . En la parte inferior, se muestra la estructura secundaria predicha para el RNA II silvestre. Los nucleótidos apuntados por las flechas no existirían ya en los putativos ciRNAs determinados por los derivados *repA*⁻ cuyas deletiones se indican.

Mediante la realización de Tests de tipo I hemos estudiado también el efecto de la presencia de pCGA9 sobre el número de copias y la estabilidad de una serie de mutantes y derivados de pLS1. Hemos visto anteriormente (Fig. 74 y Tabla 8) que, por digestión con BAL31 del DNA de pLS1 linearizado en su sitio único *Bgl*II(804), se construyeron una serie de derivados deletionados que carecen del gen *repA*. Algunos de estos plásmidos han sido secuenciados y analizados en profundidad en lo que se refiere a número de copias y estabilidad en la población homoplasmídica (Tabla 8). En todos

estos derivados, la región delecionada incluye también el extremo 3'-terminal del gen que codifica el RNA II, con lo que queda afectada la secuencia que correspondería al terminador del contratranscrito (Fig. 87). Además de la cuestión, aún sin contestar, de la terminación del RNA II en dichos plásmidos (véase en Discusión), éstos ofrecían la posibilidad de estudiar si para la putativa interacción entre el RNA inhibidor y su diana en el mRNA *repAB* se requiere la presencia de estructuras secundarias complementarias en uno y otro RNA. Asumiendo que la síntesis del RNA II comienza en la coordenada 836 de la secuencia de pLS1 (correspondiente en la cadena (-) a un residuo A localizado a 7 pb del final de la caja -10 de P_{II}), la longitud del segmento del mRNA complementario al RNA II *wt* en cada uno de estos derivados es:

pLS1ΔA12.....32 nts
 pLS1ΔA21.....31 nts
 pLS1ΔA23.....31 nts
 pLS1ΔA4.....21 nts
 pLS1ΔA34.....21 nts

Para saber si esta pequeña región común (Fig. 87) es suficiente para que un incremento en *trans* de la dosis del gen que codifica el RNA II produzca una alteración en el número de copias y en la herencia estable de estos plásmidos, hemos analizado (mediante Test de tipo I) el efecto de la presencia de pCGA9 sobre cuatro de estos derivados: dos de alto número de copias (pLS1ΔA12 y pLS1ΔA34), y otros dos con un número de copias ligeramente superior (pLS1ΔA4) o inferior (pLS1ΔA21) al de pLS1. Los resultados obtenidos al analizar el DNA total de los clones *Cm*^r procedentes de estas transformaciones fueron distintos para cada uno de estos derivados delecionados, y parecen depender (al menos en parte) del número de copias homoplasmídico de cada uno de ellos. Así, tras 37 generaciones de crecimiento en ausencia de Tc, no se observan restos del plásmido residente pLS1ΔA21 en ninguno de los clones analizados (Fig. 86). Los clones que originalmente contenían pLS1ΔA4 y pCGA9 muestran, tras las mismas generaciones sin selección para Tc^r, heterogeneidad en cuanto a la cantidad total de plásmido residente que conservan (Fig. 86). En algunos clones el derivado pLS1ΔA4 es todavía visible, aunque la cantidad total de DNA de este plásmido es inferior a la observada en la población homoplasmídica de pneumococos con pLS1ΔA4. En otros clones no se detectan, por simple tinción del gel con EtBr, restos de este plásmido. En ambos tipos de clones se analizó el porcentaje de células que conservaban el plásmido originalmente residente, mediante recuento en placas con y sin Tc. Aquellos en los que aún se detectaba plásmido pLS1ΔA4 contenían entre un 20% y un 70% de células Tc^r. Por su parte, los clones en los que no se visualizó el plásmido, contenían alrededor de

un 1% de células Tc'. Como cabría esperar para la presencia de un determinante de incompatibilidad, las células que en el momento del análisis aún conservaban pLS1ΔA4, lo van perdiendo durante el crecimiento subsiguiente en medio sin Tc. De esta forma, cuando varios de los clones en los que se visualizaba una cantidad considerable de DNA de pLS1ΔA4 (Fig. 86) se crecen en las mismas condiciones (sin Tc) durante 50 generaciones más, se observa la desaparición progresiva del DNA correspondiente a este plásmido (Fig. 88). Según se deduce del porcentaje de células Tc', simultáneamente a este descenso en la cantidad total de derivado presente en la población, se produce una disminución correlativa de la proporción de células que contienen dicho plásmido (los datos numéricos correspondientes a los distintos clones no se muestran).

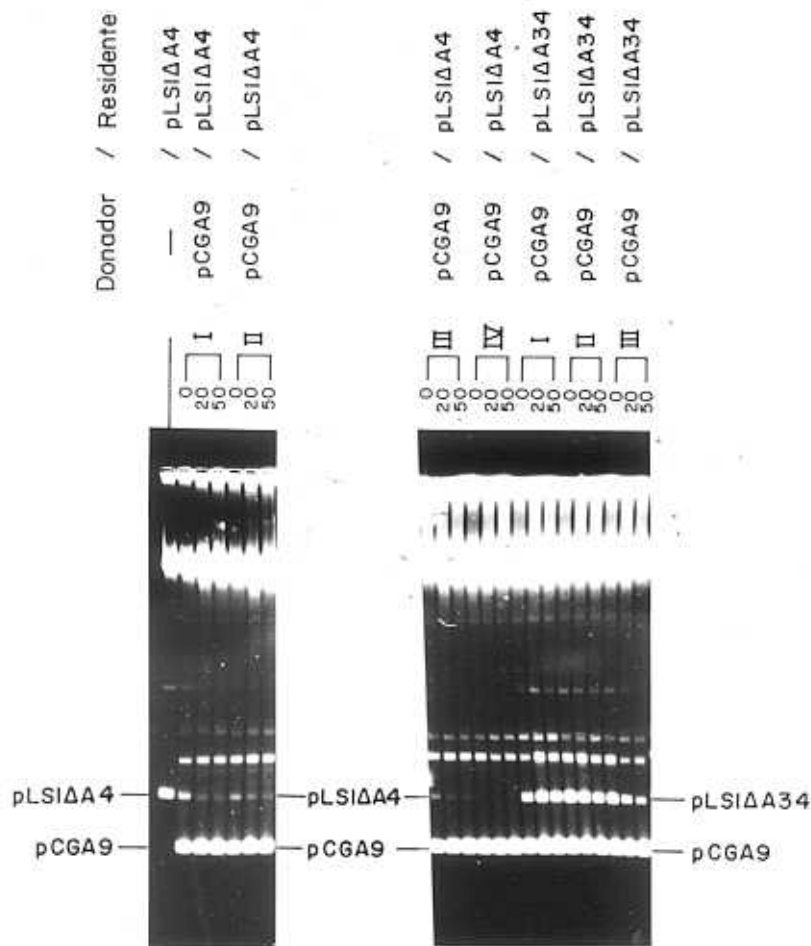


Figura 88. Pérdida de pLS1ΔA4 y pLS1ΔA34 por la presencia en *trans* del determinante del RNA II durante el crecimiento de estirpes inicialmente heteroplasmídicas. Células de pneumococos conteniendo el derivado *repA'* que se indica fueron transformadas con DNA de pCGA9, siendo seleccionados los transformantes para el marcador del plásmido donador. Varios clones (indicados con números romanos) obtenidos en cada una de las transformaciones (pLS1ΔA4 o pLS1ΔA34 como residente) fueron analizados en cuanto a contenido en DNA (preparación de extractos crudos, electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, y tinción con EtBr) tras 37 generaciones de crecimiento en Cm ($g = 0$), o tras el subcultivo durante 20 o 50 generaciones más en presencia de este antibiótico. La posición de las formas monoméricas superenrolladas de los distintos plásmidos se indica en los márgenes.

Por su parte, cuando el plásmido residente es uno de los derivados delecionados de alto número de copias (pLS1ΔA12 o pLS1ΔA34), en todos los clones transformantes analizados se observa la presencia del derivado *repA'* correspondiente, aunque siempre en cantidad inferior a la que presenta cada una de las estirpes homoplasmídicas (Fig. 86). En la mayoría de los clones analizados de una y otra procedencia, tras 37 generaciones de crecimiento en ausencia de Tc, una gran proporción de las células conserva todavía el plásmido inicialmente residente (un 50% a 100% de células son Tc'). Esto significa que se produce una disminución del número de copias plasmídico por célula, acompañada de una pequeña desestabilización que no podría ser explicada sólo en base al menor número de copias, ya que en los clones en los que la práctica totalidad de las células contiene pLS1ΔA12 o pLS1ΔA34, éstos presentan unos niveles muy parecidos a los de la estirpe homoplasmídica con pLS1. Por tanto, la pérdida de estos plásmidos podría deberse, más bien, a que la presencia de una fuente externa del inhibidor interfiere con la autocorrección de las fluctuaciones en el número de copias, tal y como ha sido postulado por Novick (1987). Además, el porcentaje de células que contienen estos derivados disminuye muy lentamente a lo largo del subcultivo de estos clones en ausencia de Tc, al tiempo que se observa una pequeña y progresiva disminución de la cantidad total del DNA de estos derivados (Fig. 88). Por lo tanto, aunque la presencia de pCGA9 produce una clara disminución en el número de copias de los derivados pLS1ΔA12 y pLS1ΔA34, esta disminución puede no ser suficientemente grande como para que el efecto sobre la estabilidad plasmídica sea realmente notorio. Si este es el comportamiento general de ciertos mutantes que, debido a su mayor número de copias, son menos susceptibles a la inhibición de la replicación causada por el gen clonado que codifica el RNA II, habría que esperar resultados similares en Tests de tipo I con pLS1*cop7* como plásmido residente y pCGA9 como donador. Este es, en cierta medida, el caso (Fig. 89). Así, en 6 de los 12 clones Cm' en los que se analizó el contenido total de DNA tras 37 generaciones, se observa una cantidad considerable de pLS1*cop7*, el cual está presente en más del 50% de las células. En otros dos clones se observan todavía restos del plásmido, mientras que en los 4 restantes la presencia de pLS1*cop7* no se detecta a simple vista, al tiempo que el porcentaje de células Tc' es bajo. Sin embargo, en comparación con los resultados obtenidos con los derivados delecionados de alto número de copias, para pLS1*cop7* se observa una mayor proporción de clones en los que el plásmido residente ha sido prácticamente eliminado de la población. Esta diferencia podría deberse a un efecto inhibitor más fuerte del determinante de incompatibilidad sobre pLS1*cop7* que sobre los derivados delecionados, quizás porque la región de posible interacción inhibidor-diana es más extensa en pLS1*cop7*.

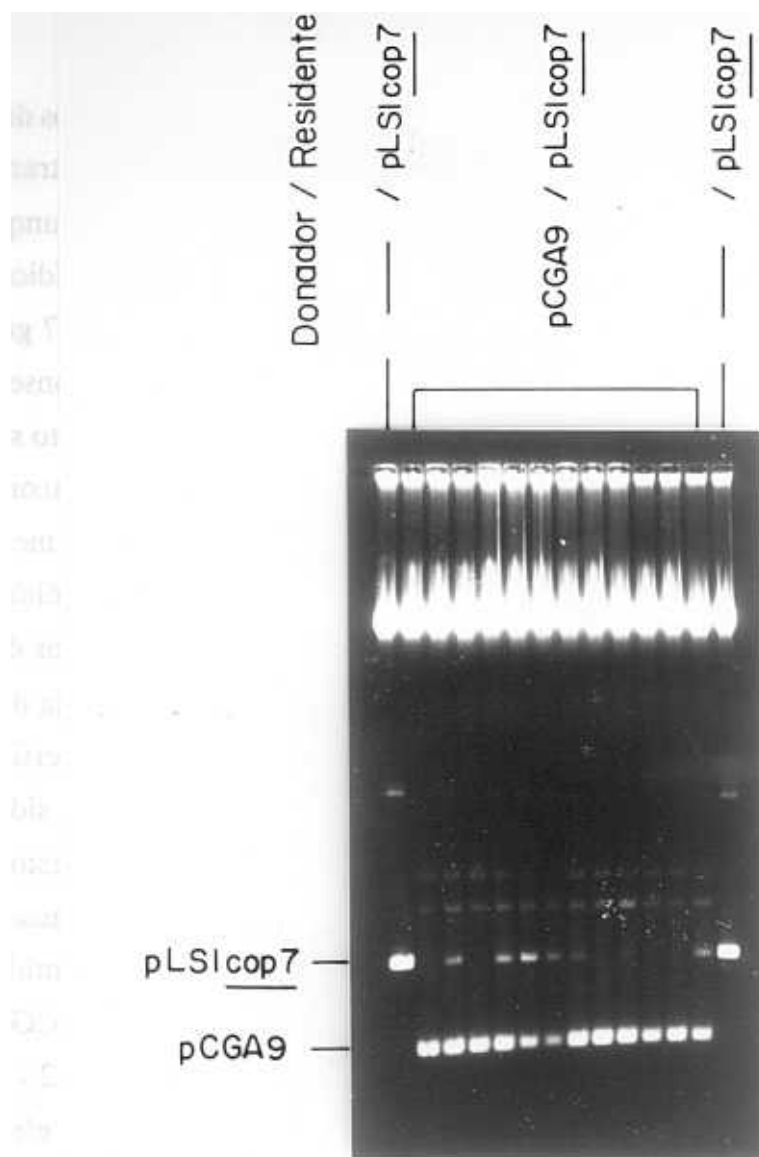


Figura 89. Efecto en *trans* del determinante del RNA II sobre pLSIcop7. Se realizaron Tests de incompatibilidad de tipo I, en los que células de pneumococos conteniendo pLSIcop7 fueron transformadas con DNA de pCGA9. El contenido en DNA de varios clones transformantes, seleccionados sólo para el marcador del plásmido donador, se analizó mediante preparación de extractos crudos, electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, y tinción con EtBr. Como control de número de copias en la situación homoplasmídica, se realizó el mismo análisis en la estirpe conteniendo pLSIcop7. La localización en el gel de las formas monoméricas superenrolladas de los plásmidos donador y residente se indica a la izquierda.

Los resultados obtenidos con los derivados que carecen del gen *repA* y de la secuencia propuesta como terminador del RNA II, muestran que tales derivados son susceptibles a un incremento en *trans* en la dosis del gen que codifica el ctRNA. Si admitimos, como parece probable, que el efecto inhibitor del RNA II es debido a la interacción con una región complementaria del mRNA *repAB*, estos resultados indican que el apareamiento de ambos RNAs por una región tan pequeña como unos 20 nts (en pLS1ΔA4 y pLS1ΔA34) es suficiente para producir dicho efecto. Además, ya que el mRNA de estos derivados carece de la región complementaria a la que formaría la única estructura secundaria propuesta para el RNA II, la interacción entre el RNA inhibitor y su diana en el mRNA no requeriría la presencia de esta estructura secundaria.

DISCUSION

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la replicación y su regulación en el plásmido de amplio espectro de huésped pLS1. Aunque el conocimiento de estos procesos es aún limitado, hemos progresado considerablemente en el estudio de un plásmido del que sólo se conocía, prácticamente, su secuencia de DNA.

El plásmido natural pMV158 y sus derivados pLS1 y pLS5, pueden establecerse y mantenerse en una variedad de huéspedes, incluida la bacteria gram-negativa *E.coli*. Aprovechando esta circunstancia, comenzamos el estudio de la replicación de estos plásmidos en extractos de *E.coli* libres de células. Este tipo de sistema *in vitro* había sido ampliamente utilizado para analizar la replicación de plásmidos de bacterias gram-negativas (Díaz y cols, 1981; Díaz y Staudenbauer, 1982a y 1982b; Staudenbauer, 1976, 1984). La replicación *in vitro* de pMV158 y sus derivados es menos eficiente que la de los plásmidos de *E.coli* R1 y ColE1, empleados como controles en estos ensayos (Figs. 10 y 11). Esto podría ser una característica general de los plásmidos de bacterias gram-positivas que replican en el sistema de *E.coli*, ya que tenemos evidencias preliminares de que el plásmido pC194 de *S.aureus* es sintetizado *in vitro* en dicho sistema con una eficiencia menor incluso que la de los plásmidos de estreptococos protagonistas de este trabajo. Los resultados presentados con respecto al replicón pLS1 constituyen la primera y, hasta el momento, única evidencia de replicación *in vitro* de plásmidos de bacterias gram-positivas en extractos de un microorganismo gram-negativo. Para otros plásmidos de bacterias gram-positivas, como pT181 de *S.aureus*, no se ha observado actividad replicativa en extractos de *E.coli*, ni siquiera cuando los ensayos se realizaron en presencia de la proteína especificada por el plásmido y requerida para su replicación, previamente purificada (Koepsel y cols, 1985b). Así, incluso dentro de la misma especie bacteriana, algunos plásmidos (como pC194) parecen más capaces que otros (como pT181) para utilizar la maquinaria replicativa de un huésped filogenéticamente alejado del que le es habitual. No obstante las diferencias comentadas entre los plásmidos de estreptococos y de *E.coli*, también hemos encontrado similitudes en lo que se refiere, por ejemplo, a la cinética de síntesis de su DNA (Fig. 12) (Staudenbauer, 1976; Díaz y cols, 1981). Además, con respecto a la actividad replicativa de extractos preparados en diferentes fases del crecimiento bacteriano, se observa que los plásmidos de estreptococos presentan un

patrón parecido al de pKN182 (Fig. 10), de forma que en todos ellos el DNA es replicado con mayor eficiencia en extractos procedentes de cultivos en fase exponencial. Por el contrario, la replicación de ColE1 ocurre muy eficientemente con independencia de la fase de crecimiento a la que se preparan los extractos (Fig. 10). El distinto comportamiento de ambos grupos de replicones podría reflejar diferencias en las condiciones y procesos requeridos para su replicación, la optimización de los cuales dependería de la fase de crecimiento. En este sentido cabe recordar que la replicación *in vitro* del DNA de ColE1 es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas pero requiere la transcripción de un RNA "primer" (Staudenbauer, 1976 y 1984), en tanto que la de R1 y sus miniderivados depende de la síntesis de una proteína específica, involucrada en la iniciación de la replicación (Díaz y cols, 1981; Díaz y Ortega, 1984). Los productos finales de la replicación *in vitro* de los plásmidos de estreptococos son formas monoméricas superenrolladas (Fig. 17). Además, estas moléculas de nueva síntesis han debido completar, al menos, una ronda de replicación, puesto que todos los fragmentos procedentes de su digestión con un enzima de restricción tienen la misma radiactividad específica (Fig. 18).

En contraste con los resultados obtenidos con pT181 y con el plásmido de amplio espectro de huésped RSF1010 (Khan y cols, 1981; Díaz y Staudenbauer, 1982a), los extractos preparados a partir de células sin plásmido pueden llevar a cabo la replicación de DNA exógeno de los plásmidos de estreptococos (Tabla 5). Esto sugiere que la acumulación de proteínas específicas para la replicación de pMV158 y sus derivados, o bien no es necesaria o bien se produce durante la realización del ensayo *in vitro*. Para los plásmidos de estreptococos existe, pues, la interesante posibilidad de comparar los resultados obtenidos al emplear extractos con y sin plásmido endógeno. Así, mientras que la replicación en extractos libres de plásmido es totalmente sensible a inhibidores de la síntesis proteica (Rif o Cm), cuando se emplean extractos con replicón pLS1 endógeno, el efecto de estos antibióticos es muy limitado (Tabla 5). De esta forma pudimos concluir que la replicación de pMV158 y sus derivados requiere una o varias proteínas especificadas por estos plásmidos. Mediante la construcción y el análisis de viabilidad de derivados delecionados de pLS1, hemos puesto de manifiesto que de las cuatro *orfs* descritas para el plásmido (Lacks y cols, 1986), sólo la correspondiente al gen *repB* es esencial para su replicación (Fig. 27). No obstante, el producto de este gen (la proteína RepB) puede ser complementado en *trans*, permitiendo la replicación de derivados *repB*⁻ que presentan un origen funcional intacto.

Otra característica destacable de los plásmidos que presentan el replicón pLS1

es que la síntesis *in vitro* de su DNA en ambos tipos de extractos (con y sin plásmido endógeno) es inhibida totalmente en presencia de Nov (25 $\mu\text{g/ml}$). Para plásmidos de bacterias gram-negativas se ha establecido, en los casos estudiados, que la replicación *in vitro* es extremadamente sensible a inhibidores de la DNA girasa (Staudenbauer, 1976 y 1984; Díaz y cols, 1981). Para los plásmidos pequeños de bacterias gram-positivas los datos son más contradictorios: Khan y cols (1981) han encontrado que la síntesis del DNA de pT181 en extractos de *S.aureus* queda reducida al 50% en presencia de Nov (1 $\mu\text{g/ml}$). Como en la anécdota de la botella medio vacía o medio llena (según se mire), este porcentaje da pie a que los autores consideren, unas veces que la DNA girasa está involucrada en la replicación de este plásmido (Khan y cols, 1981), y otras que sólo lo está en la maduración de las moléculas ya replicadas (Koepsel y cols, 1985b). Sin descartar que los requerimientos replicativos de pLS1 y pT181 sean diferentes, hay que tener en cuenta que estos autores utilizan una concentración del antibiótico 25 veces menor que la que hemos usado nosotros en el sistema de *E.coli*. Sin embargo, en ensayos de síntesis *in vitro* del DNA de pT181 en presencia de la proteína plasmídica de replicación (RepC) pura, Koepsel y cols (1985b) observan que la adición de Nov (100 $\mu\text{g/ml}$) sólo reduce la incorporación de dTMP en un 30%. Estos valores contrastan con los obtenidos recientemente para la replicación *in vitro* de otro plásmido de *S.aureus*, pC221, estrechamente relacionado con pT181 (Thomas y cols, 1990). Empleando extractos preparados a partir de la misma estirpe utilizada para ensayar la replicación del DNA de pT181, y realizando los experimentos en presencia de la proteína de replicación correspondiente (RepD) pura, se observa que la síntesis del DNA de pC221 queda inhibida en un 63% en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de Nov. Los autores consideran que esta inhibición es significativa y sugieren un papel para la actividad de la DNA girasa endógena, presente en los extractos (Thomas y cols, 1990). Sea como fuere en estos dos plásmidos de estafilococos, la síntesis del DNA de pMV158 y de sus derivados queda reducida a niveles de fondo en presencia de Nov (Tabla 5 y Figs. 15 a 17). De esta forma parece claro que la inhibición de la actividad DNA girasa en sí misma, o el efecto de relajación del DNA molde que se produce a consecuencia de esta inhibición, bloquean la replicación de los plásmidos de estreptococos en el sistema *in vitro*.

En el momento en que realizamos los ensayos de replicación *in vitro* sólo disponíamos de un mutante de pLS1 con alto número de copias, el plásmido pLS5. En ninguno de los parámetros replicativos analizados hemos encontrado diferencias entre pLS1 y su derivado pLS5. Puesto que estos resultados constituyen un dato más, muy circunstancial, acerca del posible mecanismo regulador eliminado en pLS5, serán considerados más adelante junto con otros datos, para elaborar una posible hipótesis que

explique el fenotipo de doble número de copias de pLS5.

El plásmido pLS1 replica a través de un mecanismo de círculo rodante, similar al que utilizan los colifagos de cadena sencilla M13 y ϕ X174 (Kornberg, 1980; Baas, 1985) y los plásmidos de *S.aureus* pT181 (Koepsel y cols, 1986) y pC194 (te Riele y cols, 1986a). Esta conclusión está basada en los siguientes datos: i) En ensayos de replicación *in vitro* en presencia de ddTTP, no hemos observado que ningún fragmento procedente de moléculas parcialmente replicadas presente una movilidad electroforética alterada con respecto a los fragmentos de moléculas no replicadas o totalmente replicadas (Fig. 18), de forma similar a lo que se ha descrito para pT181 (Khan y cols, 1982). Por el contrario, en plásmidos como RSF1030, que replican mediante un mecanismo Θ , se ha observado que, en moléculas que están replicando, el fragmento que contiene el origen presenta una migración electroforética alterada (Conrad y cols, 1979), indicativa de intermediarios en burbuja, característicos de este tipo de replicación. ii) Hemos detectado *in vivo* formas plasmídicas monocatenarias (Fig. 20). Estas formas son intermediarios replicativos en el mecanismo de círculo rodante. iii) Existe una señal en pLS1 (Fig. 33), a la izquierda del *ori*(+) de replicación, que está involucrada en la conversión de ssDNA a dsDNA, y su eliminación conduce a la acumulación de intermediarios plasmídicos de cadena sencilla (Figs. 30 y 31). iv) La única proteína especificada por pLS1 que se requiere para la replicación del plásmido (RepB) tiene actividades endonucleasa específica de secuencia (de la Campa y cols, 1990) y tipo topoisomerasa (Fig. 48), que han sido previamente demostradas para la proteína RepC iniciadora de la replicación de pT181 (Koepsel y cols, 1985a). v) RepB produce una incisión de cadena sencilla en la hebra codificante (+) de pLS1 (de la Campa y cols, 1990), y ésta es, según hemos comprobado, la única hebra que es convertida *in vivo* en ssDNA (Figs. 21 a 23), tal y como sucedería en un mecanismo de círculo rodante. Además, la replicación de pLS1 mediante este mecanismo es consistente con la aparente independencia de la síntesis de un RNA "primer" en el proceso de iniciación de la replicación *in vitro* (Tabla 5). Ya que hemos detectado formas plasmídicas monocatenarias en las tres especies bacterianas usadas en este trabajo como huéspedes de pLS1 (Figs. 20 y 30), nos inclinamos a pensar que la replicación de este plásmido en todas ellas tendría lugar mediante el mismo mecanismo de círculo rodante. En apoyo de esta idea están las coincidencias entre los resultados obtenidos *in vivo* en estreptococos y los que proceden del sistema *in vitro* de *E.coli*, en lo que se refiere a localización aproximada del origen de replicación, determinación de la dirección de ésta, y requerimiento de una proteína especificada por el plásmido para que se realice la síntesis replicativa de su DNA.

Cuando comenzamos a estudiar la replicación de pLS1 ya se había postulado que pT181 podría replicar mediante un mecanismo de círculo rodante (Khan y cols, 1982), y se conocían también algunos datos acerca de la secuencia de DNA en la que se localiza el origen de replicación de pT181 (Khan y cols, 1982). Sin embargo, nada se había descrito acerca de la señal involucrada en la conversión de ssDNA a dsDNA en los plásmidos de bacterias gram-positivas. Comparando la acumulación de formas monocatenarias de pLS1 y pC194 en células de distintas especies bacterianas (Figs. 29 y 30), parece evidente que la eficiencia de conversión a formas bicatenarias es específica de plásmido y huésped. En esta parte del trabajo hemos demostrado que en el plásmido pLS1 existe una señal de conversión muy eficientemente reconocida en *S.pneumoniae*. Esta señal, a la que hemos denominado *ori*(-), se localiza en una larga e imperfecta repetición inversa (Fig. 33), capaz de formar, incluso en DNA bicatenario superenrollado, una estructura secundaria detectable por digestión con S1 (Figs. 24 y 25). Aunque para explicar la funcionalidad del origen para la síntesis de la cadena retrasada bastaría con que la estructura secundaria presuntamente implicada pudiera formarse sobre ssDNA, no es éste el único caso en que dicha estructura se ha detectado sobre dsDNA. Así, Lilley (1980) ha localizado, mediante mapeo con S1, el origen de la cadena (-) de ϕ X174 sobre el DNA superenrollado de la forma replicativa.

Mediante análisis con ordenador, hemos encontrado que al menos tres plásmidos de estafilococos (pC221, pC194 y pE194) podrían formar estructuras tallo-lazo similares al *ori*(-) de pLS1 tanto en la forma general como en la secuencia de DNA (Fig. 33). En los plásmidos de estafilococos, los largos palíndromes correspondientes a estas estructuras habían sido ya descritos y asociados con una secuencia (RS_B) supuestamente utilizada para la formación de cointegrados específicos de sitio entre plásmidos no homólogos (Projan y cols, 1985). Sin embargo, no se había asignado función alguna a dichos palíndromes (Projan y cols, 1985). Nosotros propusimos que estas estructuras funcionarían como orígenes para la síntesis de la cadena retrasada de los plásmidos de estafilococos. La comparación de secuencias entre el *ori*(-) de pLS1 y los de los plásmidos de estafilococos ha revelado que existen dos zonas principales de homología: una a nivel de la base y comienzo del tallo, y otra en la región del lazo de la estructura (Fig. 33). La homología en la base corresponde al RS_B y a la región que aparea con parte del mismo al otro lado del tallo. La otra homología corresponde a una secuencia consenso: 5'-TAGCGT-3' localizada, al menos en parte, en el lazo de cada una de las estructuras, excepto en la de pE194, donde existe una discrepancia de una sola base (A en lugar de T). Ya que tanto nuestros resultados como los de otros autores (Gruss y cols, 1987) indican que la funcionalidad del *ori*(-) tiene especificidad de cadena, podemos

suponer que al menos parte de las secuencias esenciales para el reconocimiento de esta señal deben estar en una región desapareada de la estructura. Esta es una característica que cumple la secuencia consenso del lazo, que ha sido propuesta por nosotros como una región importante para el reconocimiento del *ori*(-). Gruss y cols (1987) han descrito también las señales para la iniciación de la cadena retrasada, que ellos denominan secuencias *palA*, en varios plásmidos de estafilococos. En ese trabajo, los autores consideran que la única homología significativa entre los *palA* de los siete plásmidos analizados se encuentra en la base de las horquillas, es decir, a nivel del RS_B y de la secuencia a él enfrentada (tanto apareada como desapareada) al otro lado del tallo. El resto de la estructura la consideran más variable, y la subdividen en dos grupos de distinta morfología general: *palA* de tipo pT181 (que es compartido también por pSN2 y pE12/pIM13), y *palA* de tipo pC221 (que se presenta también en pC194 y pE194). Sin embargo, en una revisión posterior en la que se incluyen ya nuestros datos acerca del *ori*(-) de pLS1, Novick (1989) encuentra que la homología en la base de las horquillas no es general para todos los elementos *palA*, ya que dos de los cinco miembros del grupo de pT181 carecen de ella. Por otra parte, Novick observa que dentro de cada grupo de secuencias *palA* existe una región altamente conservada, localizada alrededor del punto

```

pC194 2042 tcTTTATTCCAATTtctgctttattgacgttgagcctcggaac-cc-ttaacaatcccaaaacttgtcgaatggtcggcTTAATAGCTC
pOX6 166 gcTTTATTCCAATT---gctttattgacgttgagcctcggaac-cc-ttaacaatcccaaaacttgtcgaatggtcggcTTAATAGCTC
pS194 2982 gcTTTATTCCAATT---gctttatttaccattgagcctctgtac-cc-ttaacaatcccaaaacttgtcgaatggtcggcCTAATA-CTC
pC221 793 gcTTTATTCCAATT-cctctattt-gcgcgatgattct--gcgcctcc-ttaataatcctaaagct-gtccatcggtcgaaTTGATAGCTG
pE194 794 caTTTATTCCAATTtctt--ttt-gcgtgtgatgcgctgcg-tccattaaaaatcctagagctttgcaaccggaag--TTAATAGCTG
pLS1 4233 ttTTTATTCCA---tggtctattt-gacaacaagtaaccagtgactgccgtcctttgtccg--tgctcgtccgaa-----

pC194 ACGCTAT-gccga-cattcgtctgcaa-gttta-gttaagggttcttctcaacgcac-aataaaTTTCTCGGCATAAAtgcg 2206
pOX6 ACGCTAT-gccga-cattcgtctgcaa-gttta-gttaagggttcttctcaacgcac-aataaaTTTCTCGGCATAAAtgcgt 004
pS194 ACGCTAT-gc-ga-cattcgtctgcaa-gttta-gttaagggttacttctcaa--tataataaaTTTCTCGGCATAAAtgcg 2825
pC221 ACGCTAT-ctgac-cgctggcgcttttagtctaa-ttaagg-gctctcatcga---caaatagaTTTCTCGGCATAAAtgc 636
pE194 TCGCTAC-tactttcgcttacgctctaagtatatatttaagga-ctgtcacacg---caaaaag-TTTCTCGGCATAAAtgc 637
pLS1 ACGCTAaagcctttcggtcggcagctcctagcgtactctgt-cactgcttattgtcaaatagc-TTTCACGGCATAAAtcagt 4083

pUB112 586 gaaTTtTTtAATTtccctattggtcggaacctacaa--tttccatgttg-gtgagttggtactttctTGGGATT
pT181 512 gcTTTATTCCAATTtccctattggtcggaacctacagggtttatgtgttg-ttgagttggtactttctTGGGATT
pIM13 995 gc-TTATTCCAATTtccct-attggttggaaccaacaggcgttagtggttg-ttgagttggtactttctTGGGATT
pSN2 87 gcTTTATTCCAATTtccctattggtcggaaccttactcat-atgatttggtattg-gttgttaagt---TGGAAAT
pTCS1 1185 atTTTAAaATTTgct-ttttgacttcacgatatcgctttaaattgatttgattg-gttgttaagt---TGGAAAT

pUB112 AATCCCAat-caagccca-accactcggttaataaattaactaacacacttattattccaac-caataaggaaatTaaaaTgcg 435
pT181 AATCCCAattcaagtcca-accactcgcttaacaagttagctaacacatagccattccaac-caataagTTTCTCGGCATAAAtgc 672
pIM13 AATCCCAatgaaccccca-accactcgccaaagcgttggttaaacacacagccattccaac-caata-gTTTCTCGGCATAAAtgc 1151
pSN2 AATCCCAatttaaacccgacccaa-tcgccactgaagtggc-atcatattcgctttcttctcaaaatgTTTCTCGGCATAAAtgc 1219
pTCS1 AATCCCAatttaaacccgacccaa-tcgccactaaagtgg-tatcattttcgc-tttgcttggtcaaaa-TTTCTCatttcaAAAtg 68

```

Figura 90. Comparación de secuencias tipo *palA* (según Novick, 1989). Se muestra el alineamiento, en dos familias distintas, de las secuencias *palA* de diez plásmidos de *S.aureus* y de la secuencia homóloga correspondiente al *ori*(-) de pLS1. Cada secuencia se ha dividido en dos líneas por el centro de rotación del palíndromo imperfecto, y se han insertado espacios para optimizar los alineamientos. Los segmentos en mayúscula que rodean el centro de rotación están conservados dentro de, pero no entre, una y otra familia. Los que aparecen en los extremos de las secuencias son compartidos por nueve de los once elementos representados. Hay que resaltar que el autor ha representado, en todos los casos, la cadena (-) del plásmido, por lo que la secuencia RS_B corresponde al segmento conservado en el extremo 3' (al contrario que en la representación de la Figura 33, donde el RS_B aparece en el extremo 5').

de simetría (Fig. 90). En concreto, para los seis elementos *palA* de tipo pC221 que analiza (dentro de los que incluye la estructura que nosotros habíamos asignado como *ori*(-) de pLS1), la región conservada corresponde a la consenso propuesta por nosotros en el lazo de la estructura, aunque en los plásmidos de estafilococos (pero no en pLS1) la homología se extiende 10 bases más allá de esta secuencia consenso (hacia 5' sobre la cadena representada en la Fig. 90). La localización de la secuencia consenso propuesta por nosotros en una zona desapareada del *ori*(-) de todos estos plásmidos, refuerza su significado biológico. En efecto, si esta región no fuera relevante se esperaría que presentara una mayor variabilidad que la existente en regiones de apareamiento intracatenario, puesto que mutaciones en zonas desapareadas no desestabilizarían la estructura secundaria del *ori*(-) ni obligarían a mutaciones compensatorias para mantener el apareamiento. Una observación relativa a la Figura 90, extraída de una publicación de Novick (1989), es que el autor representa sistemáticamente las secuencias *palA* en la cadena (-) de cada uno de los plásmidos, por lo que el RS_B aparece, al contrario que en nuestra representación, en el extremo 3' del elemento. Nosotros consideramos, sin embargo, que, ya que estas estructuras funcionarían como señales de conversión de ssDNA a dsDNA en la cadena (+) de los plásmidos, es ésta la hebra que debe ser representada. Según se desprende de nuestros resultados, elementos *palA* pertenecientes al mismo grupo pueden ser reconocidos con distinta eficiencia en un determinado huésped. Así, mientras que el *ori*(-) de pLS1 funciona eficientemente en pneumococos, el elemento *palA* de pC194 es reconocido más pobremente en esta bacteria (Figs. 29 y 30). Por otra parte, los elementos *palA* de los plásmidos de *S.aureus* funcionan muy eficientemente en este huésped (Gruss y cols, 1987). Ya que los elementos *palA* similares al *ori*(-) de pLS1 comparten con éste la consenso de 6 bases en el lazo de la estructura, esta homología podría indicar una analogía entre los factores implicados en la conversión de ssDNA a dsDNA en uno y otro huésped (*S.aureus* y *S.pneumoniae*). El resto de la secuencia compartida por los *palA* de los plásmidos de estafilococos pertenecientes al grupo de pC221, pero distinta a la que se encuentra en el *ori*(-) de pLS1, podría ser un lugar de reconocimiento específico para la maquinaria del huésped correspondiente.

La estructura del DNA en la región del *ori*(-) de pLS1 podría ser más compleja que la mostrada en la Figura 33. En efecto, análisis por ordenador de posibles plegamientos del DNA entre las coordenadas 4000 a 4300 de pLS1 (Fig. 91), muestran una estructura compuesta por tres horquillas, una de las cuales es casi idéntica a la previamente mostrada (Fig. 33). Estructuras similarmente complejas se encontraron alrededor del *ori*(-) de otros plásmidos de bacterias gram-positivas (no se muestra).

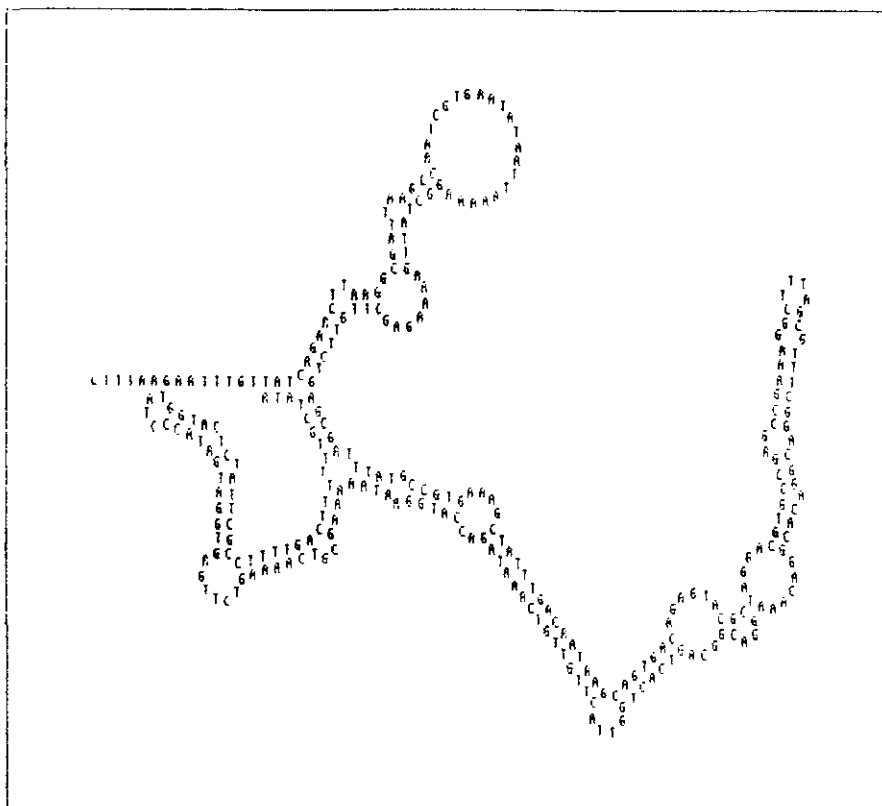


Figura 91. Estructura compleja, generada por los programas PCFOLD y MOLECULE, de la cadena (+) de pLS1 en la región del *ori*(-). Se muestra la predicción de apareamiento intracatenario para la secuencia de pLS1 entre las coordenadas 4000 y 4300. La estructura tallo-lazo cercana al margen derecho corresponde, casi exactamente, a la presentada en la Figura 33.

Buscando homologías entre la región que hemos definido como *ori*(-) de pLS1 y otras regiones del plásmido, encontramos un dato que no deja de ser curioso por más que, finalmente, no tengamos explicación plausible acerca de su significado: existe una secuencia (5'-TTTAGCGT-3') en el *ori*(-) que se repite, de forma directa, en la región que codifica el putativo RNA I. Dicho en términos de los elementos implicados, el extremo 5' del putativo RNA I sería complementario, en ocho bases, a una región del lazo del *ori*(-) que incluye la consenso de seis bases (5'-TAGCGT-3') y las dos bases adyacentes al extremo 5' de dicha consenso (Fig. 92). De esta forma podíamos imaginar un posible mecanismo regulador que explicara el mayor número de copias de plásmidos que, como pLS5, carecen del putativo RNA I: la inhibición de la síntesis replicativa de la cadena retrasada por interacción de dicho RNA con una secuencia requerida para la conversión de las formas plasmídicas monocatenarias en formas bicatenarias. Sin embargo, resultados obtenidos en este trabajo argumentan en contra de este modelo. En primer lugar, la proporción de ssDNA es la misma para pLS1 que para el mutante de copias

```

4080
TCTGAGCGATTATGCCGTGAAAGCTATTGACAATAAGCAGTGACAGAG
AGACTCGCTAAATACGGCACTTTCGATAAACTGTTATTCGTCACTGTCTC

TACGCTAGGACGTGCCGAGCCGAAAGGCTTTAGCGTTTCGGACGGACACG
ATGCGATCCTGCACGGCTCGGCTTTCGAAATCGCAAAGCCTGCCTGTGC

GACAAAGGACGGCAGTCACTGGTTACTTGTGTCAAATAGACCATGGAAT
CTGTTTCCTGCCGTCACTGACCAATGAACAACAGTTTATCTGGTACCTTA
4229

..... 258 pb .....
.....

80
CAAAAAAGAAAGACAGTAGTTGCACCTACTGTCTTCTTTTGGCGTTGTGC
GTTTTTCTTTCTGTCAACGTGGATGACAGAAAGAAAACGCAACACG

TTTAGTTCTCCTCGAACTTTTAGCGTCAAGCATATTATATCATGGGGCGAG
AAAATCAAGGAGCTTGAAAATCGCAGTTCGTAFAATATAGTACCCCGCTC
RNA I ~~~~~ -10

AAATTCTGTCAAATAATGCT
TTTAAGACAGTTTATTACGA
-35 200

```

Figura 92. Elementos de secuencia relativos a la región que codifica el putativo RNA I de pLS1. Se presenta la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas, desde la coordenada 4080 a la 200 del DNA de pLS1. Las cajas -35 y -10 propuestas para el promotor del putativo RNA I se muestran recuadradas (nótese que ambas cajas presentan la secuencia canónica de los promotores de *E.coli*). Una repetición inversa perfecta de 16 pb (con espaciado de 6 pb), que en el RNA I podría actuar como terminador de transcripción independiente de rho, se indica subrayada (coordenada 83). En negritas se representa una repetición directa de 8 pb que afecta a la región que codifica el putativo RNA I y al *ori*(-) del plásmido. Obsérvese que la consenso de 6 bases (subrayada) en el lazo de la estructura del *ori*(-) está incluida en la secuencia directamente repetida.

pLS5, ya que este último presenta, con respecto al plásmido silvestre, un número de copias doble acompañado de un incremento similar en la cantidad de monocadena acumulada (Tabla 6 y Fig. 30). Este resultado sería el esperado para un mutante que tuviera aumentada la capacidad de iniciación a partir del *ori*(+), pero que no presentara ninguna modificación en la eficiencia de utilización del *ori*(-) (como ocurre también con pLS1*cop7*). Por el contrario, si, como habíamos supuesto en el modelo, la conversión de ssDNA a dsDNA se realizara más eficientemente para pLS5 debido a la ausencia de un inhibidor que actuara a nivel del *ori*(-), hubiera cabido esperar que la relación ssDNA/dsDNA fuera menor en las células que contienen pLS5 que en las que contienen pLS1. En segundo lugar, ya que el modelo predice la acción a distancia del RNA I (su diana de acción se encontraría alejada unos 400 pb de la región que lo codifica), sería lógico atribuirle a este transcrito la capacidad de actuar en *trans*. De nuevo los resultados obtenidos contradicen el modelo, ya que el fenotipo de alto número de copias de pLS5 no es revertido a niveles silvestres cuando el putativo RNA I es suministrado en *trans* (Fig. 82B). Por todo ello, no sabemos aún si la repetición de esta secuencia de 8 pb tiene algún significado fisiológico o corresponde, simplemente, a un capricho del azar.

En pneumococos, la delección del *ori*(-) de pLS1 produce una clara reducción del número de copias plasmídico y una gran acumulación de intermediarios de cadena sencilla (Figs. 30 y 31). Sin embargo, ya que los derivados carentes de *ori*(-) pueden establecerse y ser mantenidos en la célula huésped con presión de selección, debe existir una señal alternativa, mucho menos eficiente que la genuina, para la conversión de ssDNA a dsDNA. Según sugieren algunas observaciones, esta señal alternativa se encontraría en una región con potencial para formar una estructura secundaria en forma de horquilla, en cuyo lazo se localiza la secuencia consenso central de seis bases que nosotros hemos propuesto (Fig. 34). La eliminación de ambas señales de iniciación de la cadena retrasada (genuina y alternativa) daría lugar a un plásmido inviable en pneumococos. En *B.subtilis* la situación es bastante distinta, ya que la eliminación del *ori*(-) de pLS1 no conduce a un incremento en la proporción de formas plasmídicas monocatenarias acumuladas en la célula (Fig. 30B). Por esta razón, no hay ninguna evidencia de que el *ori*(-) de pLS1 sea la señal empleada en este huésped para la iniciación de la síntesis de la cadena retrasada. Para pLS1 y sus derivados, la conversión de ssDNA a dsDNA en *B.subtilis* podría llevarse a cabo mediante un mecanismo diferente, aún desconocido y, de cualquier forma, poco eficiente. Consistentemente con esta idea, Gruss y cols (1987) encuentran que los elementos *palA* de los plásmidos de *S.aureus* parecen carecer de función en *B.subtilis*, donde se acumula una gran cantidad de formas plasmídicas monocatenarias, independientemente de la presencia o no de estos elementos. Estos autores consideran que un posible mecanismo para la iniciación de la cadena retrasada en esta especie sería la formación de un tenedor de replicación por interacción, mediada por RecA, entre moléculas monocatenarias y bicatenarias. Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha establecido pLS1 en mutantes *recA* de *B.subtilis*. Otra posibilidad sería la utilización, en este huésped, de sitios de iniciación de la cadena retrasada no específicos (Gruss y cols, 1987). En tanto que los elementos *palA* de los plásmidos de estafilococos y el *ori*(-) de pLS1 son ineficientes en *B.subtilis*, existe un elemento, denominado BA3 (McKenzie y cols, 1986), que funciona igualmente bien en *S.aureus* y *B.subtilis* como señal de conversión de ssDNA a dsDNA (Gruss y cols, 1987). La región BA3 fue identificada en pUB110, el único plásmido conocido de *S.aureus* que carece de *palA* y presenta en su lugar este origen alternativo de la cadena retrasada. El elemento BA3 tiene una considerable simetría diádica, pero no presenta similaridad con los elementos *palA* (Novick, 1989). Recientemente, van der Lelie y cols (1989) han identificado un elemento virtualmente idéntico a BA3 en el fragmento EcoRI B de pMV158, esto es, en el fragmento eliminado para construir pLS1. El elemento BA3 de pMV158 funciona como un eficiente origen de la cadena retrasada en dos bacterias gram-

positivas no relacionadas: *B.subtilis* y *Lactococcus lactis* (van der Lelie y cols, 1989). Sin embargo, nuestros resultados indican que el elemento BA3 de pMV158 es poco o nada funcional en pneumococos, ya que pLS1 presenta en este huésped un número de copias y una acumulación de formas monocatenarias similares a las observadas para pMV158 (Fig. 29). Hasta el momento, pMV158 es el único plásmido natural en el que se han encontrado dos tipos diferentes de orígenes de la cadena retrasada: uno (similar a los *palA* de los plásmidos de estafilococos) que funciona eficientemente en *S.pneumoniae*, y otro (similar al elemento BA3 de pUB110) eficiente en *B.subtilis* y *L.lactis*.

Como acabamos de ver, la importancia fisiológica del *ori(-)* de pLS1 parece ser muy diferente en *S.pneumoniae* y en *B.subtilis*. No obstante, la delección de este elemento produce un único efecto común para ambos huéspedes: una marcada inestabilización de la herencia plasmídica (Fig. 32). Esta pérdida de estabilidad es difícilmente atribuible al efecto que la eliminación de un origen de la cadena retrasada podría causar sobre la tasa de replicación plasmídica (y por lo tanto sobre la velocidad de respuesta a las fluctuaciones en el número de copias), ya que en *B.subtilis* la eficiencia de la conversión de ssDNA a dsDNA es la misma para pLS4, carente de *ori(-)*, que para pLS1 (Fig. 30B). La inestabilidad segregacional de los derivados delecionados en el *ori(-)* no se debe tampoco a una disminución en el valor medio del número de copias por célula, ya que pLS1 y pLS4 presentan en *B.subtilis* idéntica acumulación tanto de dsDNA como de ssDNA. En pneumococos, aunque la eliminación del *ori(-)* produce una importante disminución en el número de copias, la tasa experimental de pérdida (L_{ex}) para pLS4 (Fig. 32A) es mucho mayor que la esperada (L_t) para un plásmido cuyas 10 copias por equivalente genómico se distribuyeran al azar entre las células hijas. Además, el plásmido pLS7, que carece también de *ori(-)* pero que presenta un número de copias sólo ligeramente inferior al de pLS1, se pierde de la población de pneumococos con igual velocidad que pLS4 (Fig. 32A). Así, nuestros resultados indican que pLS1 y pLS5 son mantenidos muy establemente en los dos huéspedes gram-positivos gracias a la existencia de un sistema de estabilidad que se localiza, junto con el *ori(-)*, en el fragmento HindIII(3279)-NcoI(4221) de pLS1. Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio (Kramer y cols, sin publicar), indican que dicho sistema se encuentra estrechamente ligado al *ori(-)* de pLS1. Dado que para conseguir la estabilidad de herencia que se observa para pLS1 y pLS5 en *S.pneumoniae* y *B.subtilis* (Fig. 32) bastaría un reparto al azar de las copias entre las células hijas, el sistema implicado consiste, posiblemente, no en un "elemento activo" (que disminuiría L_{ex} por debajo del valor teórico L_t), sino en un "elemento auxiliar" (que aproximaría L_{ex} al valor de L_t) (Nordström y Austin, 1989). Este elemento auxiliar no parece ser un sistema de recombinación específico de sitio que

resuelva las formas multiméricas del plásmido, puesto que ni en pneumococos ni en *B. subtilis* hemos observado que pLS4 presente, con respecto a pLS1, una mayor proporción de estas formas (Fig. 31). En este sentido, el sistema de estabilidad de pLS1 recuerda al descrito para el plásmido de *E. coli* pSC101. Este plásmido (que tiene unas 15 copias por célula como término medio) presenta una región, denominada *par*, implicada en estabilidad (Meacock y Cohen, 1980). Cuando esta región se elimina completamente, el mantenimiento se hace muy inestable, a pesar de que el número de copias medio no sufre una disminución sustancial (Tucker y cols, 1984). Aún no se conoce bien el mecanismo de esta inestabilización, pero se piensa que puede reflejar una agregación no covalente de copias o, como ahora parece más probable, una fluctuación considerable de los números de copias en células individuales (Nordström y Austin, 1989). Recientemente se ha visto que la región *par* de pSC101 es un sitio de unión específico de la DNA girasa (Wahle y Kornberg, 1988), de forma que el fenotipo de inestabilidad de mutantes *par* podría deberse a un defecto en la topología del DNA. De igual forma, el elemento auxiliar de pLS1 podría actuar disociando agregados plasmídicos o disminuyendo las fluctuaciones del número de copias plasmídico en células individuales que van a dividirse.

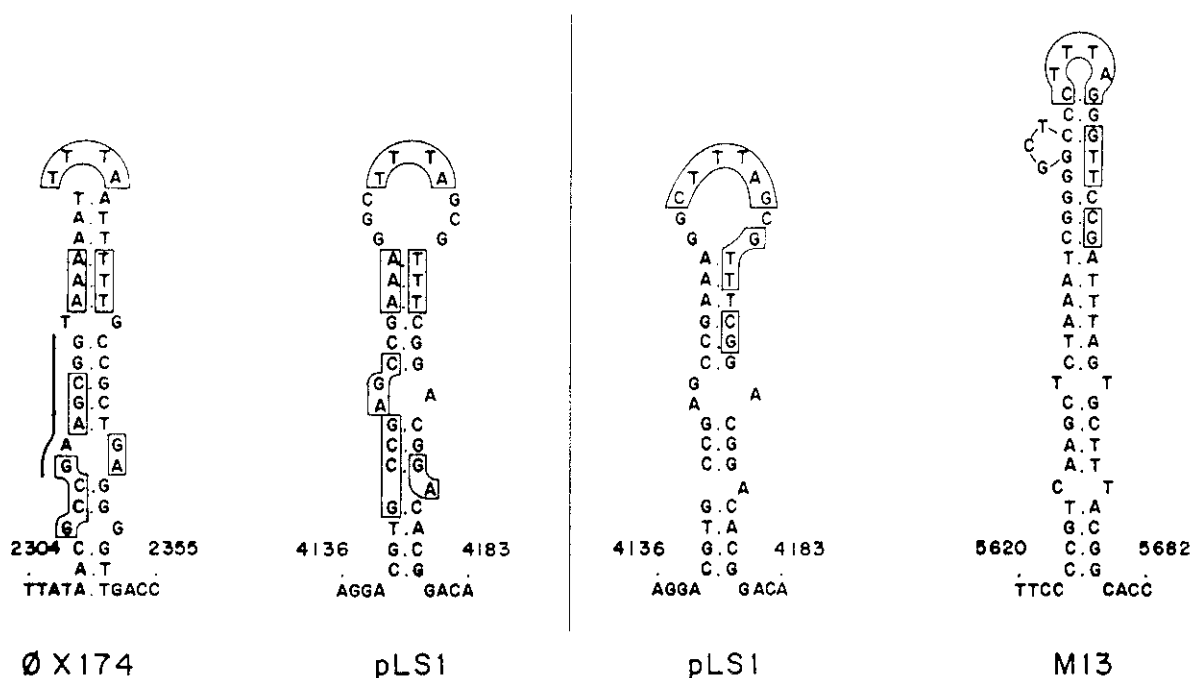


Figura 93. Comparación del *ori(-)* de pLS1 con los orígenes de la cadena complementaria de los bacteriófagos ϕ X174 y M13. Se muestra el lazo y la parte superior del tallo de la estructura secundaria propuesta como señal de conversión ssDNA \rightarrow dsDNA de pLS1. Las secuencias que se presentan como señales de conversión en los colifagos ϕ X174 y M13 han sido tomadas de Kornberg (1980) y de van Wezenbeek y cols (1980), respectivamente. Las regiones homólogas se han recuadrado. El sitio de reconocimiento de n' sobre la secuencia de ϕ X174 (Baas, 1985) se indica subrayado.

Una característica que distingue a pLS1 de la mayoría de los plásmidos de bacterias gram-positivas es su capacidad para establecerse en *E.coli*. Esto demuestra que su *ori*(+) de replicación es funcional en este huésped y que alguna señal plasmídica es reconocida, aunque de forma poco eficiente, por la maquinaria bacteriana para la conversión de ssDNA a dsDNA. Esta señal podría corresponder al *ori*(-) de pLS1, ya que los derivados que carecen de él, pLS4 y pLS7, no pudieron ser establecidos en *E.coli* (Tabla 6). Esto parece indicar, además, que la señal alternativa localizada alrededor de la coordenada 2400 de pLS1 (Fig. 34) no serviría en el huésped gram-negativo como origen de la cadena retrasada. La comparación del *ori*(-) de pLS1 con los orígenes de la cadena complementaria de los colifagos de cadena sencilla revela la existencia de grupos de bases homólogas (Fig. 93). En el caso de ϕ X174 (Kornberg, 1980), aunque el lazo no presenta la secuencia de seis bases que hemos propuesto como consenso, se detectan varias regiones de homología localizadas tanto en el tallo como en el lazo de la estructura de los *ori*(-) fágico y plasmídico. La comparación con M13 (van Wezenbeek y cols, 1980) muestra que una secuencia similar a la consenso: 5'-TAGGGT-3' se localiza parcialmente en el lazo del elemento fágico. Además, la homología se extiende a ambos lados de esta secuencia, de forma que las seis bases que constituyen el lazo del elemento de M13 son idénticas a la región central del lazo del *ori*(-) de pLS1 (Fig. 93). Un análisis cuantitativo de las homologías entre el *ori*(-) de pLS1 y el resto de los orígenes de la cadena retrasada mostrados en este trabajo (Fig. 94) pone de manifiesto que, en una región de 26 bases, hay homologías del 50% y 46% con los elementos de ϕ X174 y M13, respectivamente. El grado de homología con los elementos *pala* de los plásmidos de *S.aureus* es menor, y corresponde a un 38% para pE194, y un 35% para pC221 y pC194. Por su parte, la señal alternativa propuesta para pLS1 (Fig. 34) muestra, en esta región, un nivel de

pLS1 (4150)	CGAAAGGCTTT TAGCGT TTCCGGACGGA
ϕ X174 (2320)	GT***AAT*****ATT***GCCG*T**
M13 (5643)	G*GCTCC*****G***C**ATTTAG
pE194 (698)	GCG**A*TAG*****ACAGCT*TTA*
pC221 (695)	A*CGGTCAGA*****CAGCT*TC*
pC194 (2148)	AATGTC*GCA*****GAGCT*TTA*
pLS1 alternativo (2409)	TTCTTAT*G*****GCT*TCATT

Figura 94. Comparación de la secuencia de nucleótidos de regiones de DNA que contienen las señales de conversión ssDNA \rightarrow dsDNA de fagos y plásmidos. La comparación se limitó a 26 pb, y se buscó la máxima homología sin permitir huecos. Las coordenadas indicadas entre paréntesis son las dadas por: Lacks y cols (1986) para pLS1, Kornberg (1980) para ϕ X174, van Wezenbeek y cols (1980) para M13, Horinouchi y Weisblum (1982a) para pE194, Projan y cols (1985) para pC221, y Horinouchi y Weisblum (1982b) para pC194. La secuencia consenso de seis bases en el lazo de la estructura del *ori*(-) de pLS1 se indica subrayada y en negritas. (*) representa identidad de nucleótidos.

homología de un 35% con el *ori*(-) genuino, valor similar al encontrado para la homología con *palA* de pC194. En la actualidad no podemos descartar que la similitud entre el *ori*(-) de pLS1 y los orígenes de la cadena complementaria de los fagos ϕ X174 y M13 sea uno de los requisitos que cumple el plásmido de estreptococos para poder replicar en *E.coli*. Sin embargo, hay un hecho curioso en estas similitudes: el *ori*(-) de pLS1 presenta una homología igualmente alta tanto con el elemento de M13 como con el de ϕ X174, a pesar de que el mecanismo para primar la síntesis de la cadena complementaria es diferente para ambos colifagos. Así, en tanto que en M13 se sintetiza un pequeño transcrito por la RNA polimerasa bacteriana, ϕ X174 utiliza un mecanismo mucho más complejo que involucra al primosoma (Kornberg, 1980). Además, hay que señalar que no hemos encontrado secuencias homólogas a las consenso para la unión de componentes del primosoma en la cadena codificante de pLS1. Nada conocemos aún del mecanismo utilizado para la iniciación de la síntesis de la cadena retrasada en pLS1. Otro tanto ocurre en la mayoría de los plásmidos cuya replicación sucede, o así se supone al menos, mediante un mecanismo de círculo rodante. Tan sólo para pUB110 (que tiene un origen de la cadena retrasada de tipo BA3) se ha sugerido la implicación de la RNA polimerasa del huésped en la iniciación de la síntesis de la cadena retrasada, ya que se ha observado *in vivo* la inhibición de la conversión de ssDNA en dsDNA en presencia de Rif (Boes y cols, 1989). Asimismo quedan todavía por conocer, tanto para pLS1 como para los otros plásmidos, el resto de las funciones del huésped implicadas en la conversión de intermediarios monocatenarios en formas bicatenarias totalmente replicadas. Para pLS1 existe, no obstante, un dato interesante: este plásmido no pudo ser establecido en mutantes *polA* de *E.coli* a menos que llevara clonado el gen *polA* de *S.pneumoniae* (Lacks y cols, 1986). Estos resultados podrían reflejar el requerimiento de la DNA polimerasa I para completar la síntesis de la cadena retrasada, de igual forma que la actividad exonucleasa 5'→3' de este enzima es esencial en la replicación de los colifagos de cadena sencilla para obtener la forma replicativa final (RFI) a partir de la forma RFII, que aún contiene el RNA "primer" (Kornberg, 1980).

Al igual que sucede con la síntesis de la cadena retrasada de pLS1 a partir del *ori*(-), nada sabemos todavía acerca de las funciones bacterianas requeridas para la replicación del DNA de este plásmido a partir del *ori*(+). Es de suponer, sin embargo, que en este proceso intervienen, como mínimo, la proteína SSB de unión a DNA de cadena sencilla (que recubriría la hebra que se va desplazando), la DNA polimerasa III y una helicasa. En este trabajo nos hemos centrado en el análisis de las estructuras y funciones plasmídicas que intervienen en la replicación del DNA de pLS1. El origen y la dirección de la síntesis de la cadena líder de pLS1 se han estudiado tanto *in vivo* como

in vitro, obteniéndose en ambos casos resultados coincidentes. Así, en extractos de *E.coli* libres de células hemos establecido que la replicación tiene lugar en el mismo sentido que la transcripción de los mRNAs de pLS1 (Fig. 19). Idéntica dirección de síntesis de la cadena líder se deduce, a partir de la especificidad de hebra de las formas monocatenarias acumuladas en pneumococos, para la replicación *in vivo* de pLS1 y sus derivados (Figs. 21 a 23). En cuanto a la localización del *ori*(+), el sistema de replicación *in vitro* nos ha permitido mapear el sitio de iniciación de la cadena líder en el fragmento HinFI D (443 pb) de pLS1 (Figs. 18 y 19). Por su parte, mediante el análisis de derivados delecionados viables en *S.pneumoniae* hemos delimitado el origen funcional dentro de una región de 247 pb que se extiende entre las coordenadas 402 y 648, y que se encuentra totalmente incluida en el fragmento HinFI D (Fig. 27). En esta región existen dos tipos notorios de elementos de secuencia: los 3 iterones y las dos repeticiones invertidas que podrían dar lugar a las horquillas I y II (Fig. 28). Nosotros propusimos que, a semejanza de lo que se había descrito en algunos replicones de bacterias gram-negativas, los iterones de pLS1 jugarían un papel en el reconocimiento del origen plasmídico por la proteína iniciadora de la replicación. También aventuramos que las horquillas I y/o II serían elementos importantes en la iniciación de la síntesis de la cadena líder. Estas dos predicciones han sido posteriormente confirmadas (de la Campa y cols, 1990), demostrándose que RepB se une específicamente a los iterones e introduce una incisión en la cadena codificante de pLS1 entre los nucleótidos 448 y 449 (G/A), localizados en un extremo del lazo de la horquilla I, a 85 pb del primer nucleótido del iterón I1 (Fig. 28). En el momento en que realizamos esta parte del trabajo, las características del *ori*(+) de pLS1 resultaban muy peculiares. A diferencia de otros plásmidos de bacterias gram-positivas, como pT181 (Khan y cols, 1982) y pE194 (Villafane y cols, 1987), cuyos orígenes de replicación se habían localizado (aunque erróneamente en el caso de pE194) dentro de la secuencia codificante del correspondiente gen *rep*, el *ori*(+) de pLS1 se encuentra en una región intergénica. Además, para pT181 se había determinado la región del origen que interacciona específicamente con RepC (Koepsel y cols, 1986), no detectándose, ni en ésta ni en regiones próximas, la existencia de secuencias directamente repetidas. Estos elementos de secuencia tampoco se habían localizado en la región del DNA de pE194 en la que Villafane y cols (1987) delimitaron el origen de replicación. Así, pLS1 es el primer ejemplo descrito en la literatura de un plásmido de bacterias gram-positivas que contiene iterones para la unión de la proteína de replicación. Más recientemente se ha encontrado que el plásmido críptico pADB201 de *Mycoplasma mycoides* presenta tres repeticiones directas y contiguas de una secuencia de 21 pb (Bergemann y cols, 1989). Los autores, sin embargo, no asignaron ninguna función a esta secuencia repetida. Cuando comparamos la región del *ori*(+) de pLS1 (coordenadas 402 a 648) con la secuencia de

```

pLS1 (388,475)    AGGGAGATGTTGTGGGGGATTTTTCTCCGAAAAAATCTAAAA
pE194 (840,919)  TTCTTAGAT**T*****TTA***AGGGGA*****C**A-----
pADB201 (40,108) TCCTTAGAT*AA*****TCACGACC-----A-----
pLB4 (1185,2050) G*AT*A*AAAAT*****C**-----*****

```

```

pLS1      TATGGGGGGGCTACTACG/ACCCCCCTATAGTG---CCGA-GTGCCAAA
pE194     -----*****G*****/**T****CC***-TGT**ATT*-***TT
pADB201   -----*****/*TAG****C*AT*A*TGAT--TT**A**TG
pLB4      C*-*****-*****/**A****CC-*-*TGT**ATT*-**ATT

```

Plásmido	Sitio de corte	Espaciado	Iterón	Número
pLS1	TACTACG/A	(85 pb)	CGGCGACTTTT	3
pADB201	TACTACG/A	(54 pb)	TGTTTGTGCTAGCATTTGTAA	3
pE194	TACTACG/A	(14 pb)	GTCCATT	3
pLB4	TACTACG/A	(13 pb)	GTCCATT	2

Figura 95. Comparación de la secuencia de DNA del *ori*(+) de pLS1 con la de regiones homólogas en otros plásmidos de su misma familia. Arriba se muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena (+) de pLS1 en los alrededores del sitio de corte por RepB, alineada con secuencias homólogas presentes en los demás miembros de la familia. Las coordenadas (entre paréntesis) de las regiones mostradas corresponden a la numeración dada por: Lacks y cols (1986) para pLS1; Horinouchi y Weisblum (1982a), con las correcciones hechas por Villafane y cols (1987), para pE194; Bergemann y cols (1989) para pADB201; y Bates y Gilbert (1989) para pLB4. Se indican los huecos permitidos para mejorar el alineamiento (-), y las identidades con la secuencia de pLS1 (*). El sitio de corte por RepB en el *ori*(+) de pLS1 (G/A; de la Campa y cols, 1990), y los putativos sitios de corte por las correspondientes proteínas Rep de los otros plásmidos, predichos en base a la homología con la secuencia de pLS1, se indican (/). En la tabla inferior se muestran, para cada plásmido, las secuencias tanto del propuesto sitio de corte por la proteína Rep como de los iterones donde se uniría la proteína, localizados a 3' del sitio de corte. También se indica el número de veces que se repite cada iterón, y la distancia entre el sitio de corte por Rep y el inicio de las repeticiones (espaciado).

varios plásmidos de bacterias gram-positivas, encontramos que en tres de ellos: pE194 de *S.aureus* (Iordanescu, 1976), pADB201 de *M.mycoides* (Bergemann y cols, 1989) y pLB4 de *Lactobacillus plantarum* (Bates y Gilbert, 1989), existe una región altamente homóloga a la horquilla I de pLS1, seguida a corta distancia por una secuencia no conservada de longitud variable (iterón), que se repite 2 o 3 veces de forma directa (Fig. 95). Ya que la posición del DNA de pLS1 donde se produce la rotura por RepB se encuentra en la región conservada, podemos predecir el sitio donde las putativas proteínas Rep de los otros plásmidos producirán el corte de cadena sencilla con el que se iniciaría la replicación (Fig. 95). La distancia entre el sitio de rotura y el primer nucleótido del iterón más proximal es bastante reducida para pLB4 (13 pb) y pE194 (14 pb), y algo mayor para pADB201 (54 pb), aunque sin alcanzar el valor del espaciado en pLS1 (85 pb). El iterón de mayor longitud (21 pb) se encuentra, paradójicamente, en el plásmido más pequeño

(pADB201, de 1717 pb) y se repite, además, tres veces. Estos iterones de pADB201 corresponden a las tres repeticiones directas detectadas por Bergemann y cols (1989). Otro hecho curioso es que pE194 y pLB4 tienen el mismo iterón básico (5'-GTCCATT-3') que se repite dos veces, aunque en el plásmido de *S.aureus* existe una tercera (más distal) repetición imperfecta con la secuencia: 5'-GTCCAAA-3'. Por analogía con pLS1, podemos predecir que los iterones de todos estos plásmidos son los sitios de unión específica de las correspondientes proteínas Rep. Esto explicaría resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio según los cuales la proteína RepB de pLS1 es incapaz de relajar *in vitro* el DNA superenrollado de pE194. Había algo, sin embargo, que no dejaba de ser sorprendente: la región del DNA de pE194 que contiene tanto los iterones como la secuencia conservada en la que, supuestamente, RepF produciría la incisión (coordenadas 840 a 926) se encuentra fuera de la zona en la que Villafane y cols (1987)

pLS1	(RepB)	MAKEKARYFTFLYPESIPSDWELKLETLG
pADB201	(ORF A)	MSTDIKKRDWTLLEVYPDSAPEDWKEILDQDG
pE194	(RepF)	MSENVIKETENKKNSRGKRNWTFVLYPESAKAEWLEYLKLKH
pLB4	(RepB)	MKSESKIDWTVPRPNKNPKTKQPYKRGKRNWGI VVPESLLENW--KDIIRQ

pLS1	(RepB)	VPMAISPLHDKDKSSIKGQKYKKAHYHVLVIAKNPVTADSVRKKIKLLLG
pADB201	(ORF A)	VEY-FGALHDKDVDP--DGTIKKPHYHIVLAYSGPTTFDDVKTLCDTLDS
pE194	(RepF)	IQFVVSPLHDDTDT-EGRM-KKEHYHILVMYEGNKS YE----QIKIITE
pLB4	(RepB)	EPIAVSPLHDKDVNP-DGEK-KKSHYHLVLNYKGNKSFEQIDEIARSLRA

pLS1	(RepB)	EKSLAMVQVVLNVENMYLYLTHESKDAIAKKKHVYDKADIKLINNFIDR
pADB201	(ORF A)	PKPLPL----DGVGGMWRYMTH--KDD--PEKYQYDDSIIFTGDGFDISD
pE194	(RepF)	ELNATIPQIAGSVKGLVRYMLH--MDDPNKFK--YQKEDMIVYGGVDVDE
pLB4	(RepB)	PAP----QRISSLTGAVRYLTH----MDNPEKYQYDNADIETFGGFDLES

pLS1	(RepB)	YVTLDVEEKTELFNVVSLIRAYTLQNI FDL YDFIDENGETYGLTINLVN
pADB201	(ORF A)	YKELTKKEISDIKGLIDI IKDKQITEYSTFIDVVS DLGDI DVFDVASKD
pE194	(RepF)	LLKKT TTD RYKLIKEMIEFIDEQGI VEFKSLMDYAMKFKFDDWFPLLCDN
pLB4	(RepB)	CLALSTGDKRQALRDLAFISENEIMHLKDFADYCMSEEPAGW-FELLT

pLS1	(RepB)	EVIAGKTGFMKLLFDGAYQRSKRGTKNEER
pADB201	(ORF A)	TIFFTSYIDSF RFKLREEMEQEKYTK
pE194	(RepF)	SAYVIQEYIKSNRYKSDR
pLB4	(RepB)	E---RNTLFIKEYIKSNWQKQYASKNINKMSD

Figura 96. Comparación de la secuencia de aminoácidos de RepB de pLS1 con la de las proteínas Rep de otros plásmidos de su familia. El alineamiento se realizó permitiendo huecos (-) para mejorar la homología con RepB. Sólo se han recuadrado los bloques de máxima homología comunes a las cuatro proteínas. Sobre la secuencia de RepB se indica, mediante un *, la Met con la que se iniciaría la putativa RepB.

habían localizado el origen de replicación de este plásmido (coordenadas 1389 a 1588). En un trabajo posterior, Dempsey y Dubnau (1989) redefinieron el origen de pE194 entre las posiciones 864 y 1129, lo que ya encaja bien con nuestras predicciones.

Paralelamente a lo que ocurre con el *ori*(+), existe también homología significativa entre la proteína iniciadora de la replicación (RepB) de pLS1 y las correspondientes Rep de los plásmidos pE194 (RepF; Minton y cols, 1988), pLB4 (RepB; Bates y Gilbert, 1989) y pADB201 (ORF A; Bergemann y cols, 1989). La comparación simultánea de estas cuatro proteínas (Fig. 96) pone de manifiesto la existencia de bloques de aminoácidos conservados, que se encuentran en la mitad N-terminal de las diferentes Rep. Ya que todas estas proteínas deben tener las mismas actividades enzimáticas, las regiones conservadas podrían estar formando parte del dominio activo. Esto explicaría la falta de funcionalidad de la putativa proteína RepB' (codificada por el plásmido pLS1ΔA15), la cual carecería del primer bloque de aminoácidos comunes (Fig. 96). Así, la viabilidad de pLS1ΔA15 depende de la presencia de otro plásmido capaz de proporcionar RepB funcional en *trans*. Cuando se analizan los seis "dotplot" resultantes de la comparación entre sí de estas cuatro proteínas Rep, se observa de nuevo la homología en la región N-terminal (Fig. 97). Sin embargo, sólo el "dotplot" entre RepF de pE194 y RepB de pLB4 muestra una homología que se extiende al extremo C-terminal de ambas proteínas (Fig. 97). Esto, junto con la observación de que los orígenes reconocidos específicamente por estas dos proteínas son los únicos que presentan idénticos iterones (Fig. 95), sugiere que la región C-terminal de las proteínas Rep sería la involucrada en el reconocimiento y la unión específica al *ori*(+). De modo similar, para las Rep de la familia de pT181 se ha mostrado que el dominio C-terminal de las proteínas está implicado en el reconocimiento y la unión específica, mientras que la región conservada central contiene el sitio activo (Novick, 1989).

Basándonos en las homologías tanto a nivel de *ori*(+) como de proteína iniciadora de la replicación, podemos establecer una tercera familia de plásmidos de bacterias gram-positivas, con pLS1 como prototipo, que se sumaría a las dos familias previamente establecidas entre los plásmidos de *S.aureus* con maquinaria replicativa bien conocida (Novick, 1989). Las características principales de estos tres grupos se pueden resumir como sigue:

a) Familia de pT181. Las proteínas Rep correspondientes exhiben gran homología. Las secuencias de DNA alrededor de los respectivos sitios de corte por Rep muestran un alto grado de similitud al sitio correspondiente en el DNA del fago M13.

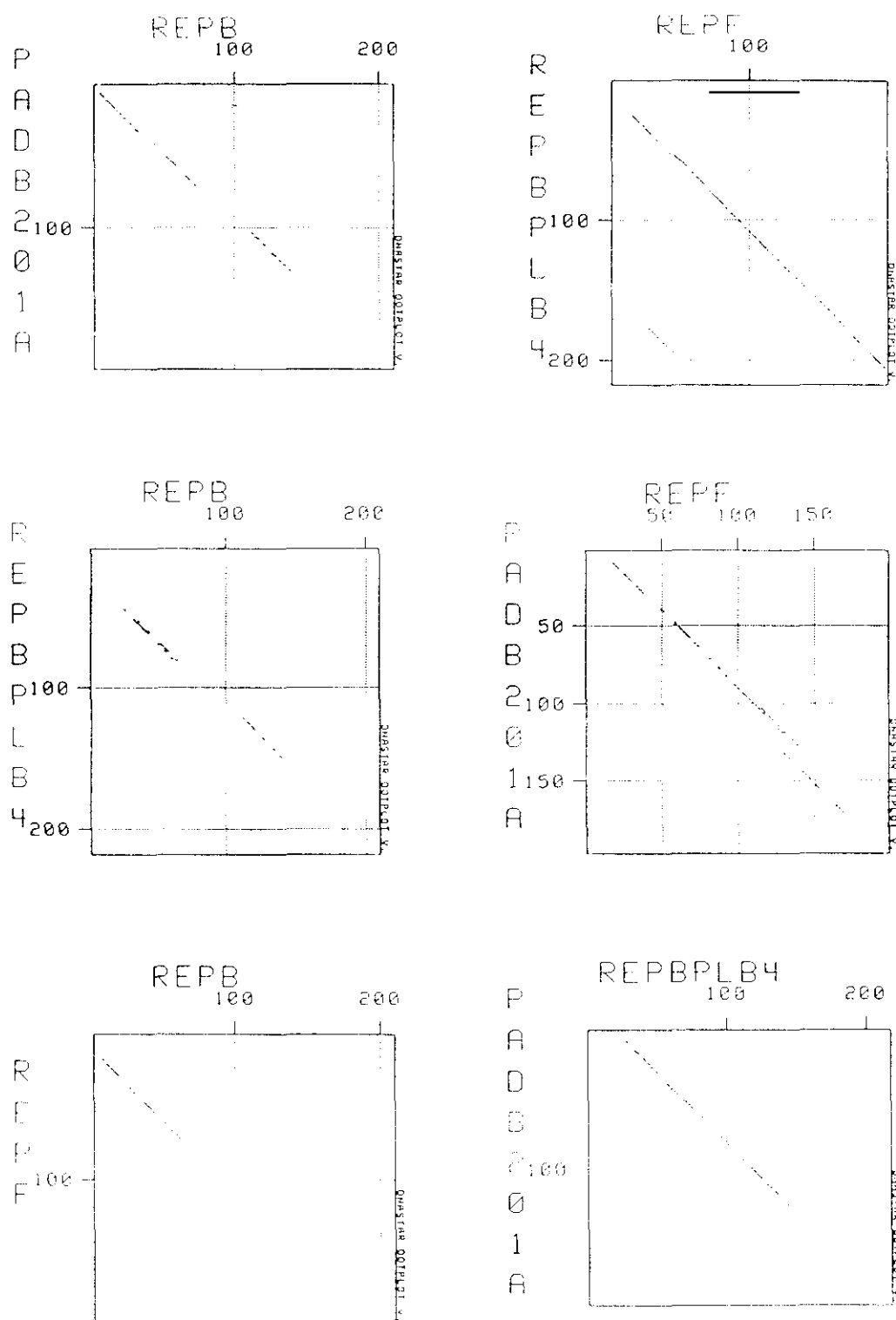


Figura 97. Comparación de las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pLS1 (programa DOTPLOT). En cada una de las seis representaciones se indican, en los bordes superior e izquierdo, las proteínas comparadas. Proteínas: RepB de pLS1, ORF A de pADB201, RepF de pE194, y RepB de pLB4. Los puntos indican las homología entre los residuos en la posición señalada por los números.

b) Familia de pC194. Sus respectivas proteínas Rep están también claramente relacionadas entre sí. Las secuencias de DNA alrededor de los sitios de corte exhiben una homología sustancial con la secuencia equivalente en ϕ X174.

c) Familia de pLS1. Incluye, hasta el momento, los plásmidos pLS1, pE194, pADB201 y pLB4. Entre las proteínas Rep de este grupo existe homología a nivel de la región N-terminal. La comparación de estas Rep con las de las otras dos familias no revela la existencia de homologías significativas. Los *ori*(+) de los miembros de esta familia presentan una secuencia conservada (donde se incluye el sitio de corte por la proteína Rep), y una región no homóloga, constituida por iterones, para la unión específica de la Rep correspondiente. A nivel de la secuencia de DNA en el origen, tampoco hemos encontrado homología entre los miembros de esta familia y los de las otras dos. Otra característica de los miembros de esta familia es que el *ori*(+) se encuentra a 5' del sitio de iniciación del mRNA *rep*.

Una importante cuestión referente al modo de acción de RepB sobre el *ori*(+) de pLS1, es si la actividad endonucleásica inicial de la proteína requiere o no la formación de la estructura cruciforme correspondiente a la horquilla I (Fig. 28). Aunque falta aún demostrar experimentalmente la capacidad o incapacidad de RepB para actuar sobre un DNA bicatenario relajado o lineal, los datos de que disponemos apuntan a la necesidad de un sustrato superenrollado. Así, cuando el DNA usado como molde en los ensayos de replicación *in vitro* contenía una alta proporción de formas OC, se observó una importante disminución en la eficiencia de síntesis de nuevo DNA. Además, en un DNA que replica mediante un mecanismo de círculo rodante, la inhibición de este proceso por Nov implicaría que el molde correcto es una forma superenrollada. Tal ha sido establecido para la etapa RF \rightarrow RF de la replicación del DNA de ϕ X174 (Kornberg, 1980), y constituye también nuestra interpretación del efecto de la adición de Nov sobre la replicación *in vitro* del DNA de los plásmidos basados en el replicón pLS1 (Tabla 5 y Fig. 17). Ya que la superhelicidad negativa del DNA permite estabilizar estructuras secundarias formadas en regiones con repeticiones inversas (Lilley, 1980), el requerimiento replicativo de un molde superenrollado conferiría un significado biológico a la formación de la horquilla I del *ori*(+) de pLS1, dentro de la cual se encuentra el sitio de corte por RepB. Hay que tener en cuenta, además, que la estructura correspondiente a la horquilla I puede formarse, realmente, en el DNA superenrollado de pLS1, tal y como hemos comprobado por mapeo de sitios sensibles a S1 (Figs. 24, 25 y 35). Por otra parte, dado el tamaño y contenido en G-C de la repetición inversa responsable de la formación de la horquilla I (conservada, además, en todos los miembros de la familia de pLS1), parece improbable que esta secuencia ocurra por puro azar, y su existencia respondería, más bien, a una

horquilla I es la importancia de las regiones de DNA vecinas, ya que éstas pueden interferir con la formación de estructuras secundarias. La existencia de secuencias que inhiben en *cis* la funcionalidad del origen de replicación se ha comprobado para pT181: el *ori*(+) de este plásmido, clonado en pE194, no pudo ser activado por RepC en *trans* a menos que se eliminara el promotor del ctRNA de pT181 o el elemento *palA* de pE194 (Novick, 1989). En nuestro caso, no hemos conseguido que el suministro de RepB en *trans* active el *ori*(+) de pLS1 clonado en el sitio HindIII de pC194. Sin embargo, para pE194 (que presenta una organización funcional y un *ori*(+) muy similares a los de pLS1) se ha podido localizar *in vivo* el origen de replicación ensayando la capacidad de distintos fragmentos de su DNA, clonados en un derivado de pUC18, para producir replicación dependiente de la proteína RepF suministrada en *trans* (Sozhamannan y cols, 1990). Esto nos hace pensar que la razón de nuestro fracaso en la complementación en *trans* del *ori*(+) de pLS1 sea una desafortunada elección del vector y/o sitio de clonaje, y que puede haber secuencias inhibitoras en *cis* que deberían ser eliminadas para conseguir la activación del origen.

La formación de estructuras secundarias dependiente de la superhelicidad del DNA ha sido considerada importante, también, en otros sistemas cuya replicación tiene lugar mediante un mecanismo tipo círculo rodante. Así, la proteína gpII del fago f1, aunque se une a su DNA independientemente de la superhelicidad, sólo realiza el corte específico sobre DNA superenrollado (Horiuchi, 1986). Para pT181 las conclusiones son menos claras, ya que los autores han ido modificando a lo largo del tiempo su opinión acerca de la importancia de las estructuras secundarias y del superenrollamiento del DNA en el proceso replicativo. En esta evolución, los autores comienzan considerando que el origen de replicación de pT181 carece de elementos que puedan dar lugar a estructuras secundarias (Khan y cols, 1982). Congruentemente, a partir de los resultados obtenidos en ensayos de replicación *in vitro*, interpretan que las formas plasmídicas relajadas pueden actuar como molde (Khan y cols, 1981), y que la Nov no inhibe la síntesis del DNA de pT181 (Khan y cols, 1982). Una posterior revisión de la secuencia de DNA en el origen, les reveló la existencia de una repetición inversa que podría formar una estructura secundaria en el DNA superenrollado (Koepsel y cols, 1986). Sin embargo, Koepsel y Khan (1987) mostraron que, *in vitro*, RepC puede introducir el corte específico en un DNA lineal de doble cadena, sobre el que no se formarían estructuras secundarias. Muy recientemente, Noirot y cols (1990) han detectado *in vitro* (en experimentos de mapeo con S1 similares a los mostrados en esta Tesis), la existencia de una estructura cruciforme en el origen de replicación de pT181. La formación de esta estructura secundaria (correspondiente a la repetición inversa del origen) depende de la superhelicidad del

función precisa. A nuestro entender, esta función consistiría en exponer el sitio de corte por RepB en el lazo de la horquilla I.

Asumiendo la importancia de la generación de la horquilla I para la funcionalidad del *ori*(+) de pLS1, hemos encontrado una posible explicación para el fenotipo de doble número de copias de pLS5 y otros plásmidos que, como él, carecen del putativo RNA I y de la secuencia que daría lugar a la horquilla III (Figs. 26 y 92). Efectivamente, a la temperatura fisiológica de 37°C, la horquilla III constituye el principal sitio sensible a S1 en el DNA superenrollado de pLS1 (Fig. 24). Esto significa que, en un momento dado, la mayoría de las moléculas que tienen disminuida su tensión torsional lo han hecho a través de la generación de la horquilla III. Además, la eliminación de esta estructura cruciforme favorece la formación de la horquilla I, ya que ésta constituye un sitio más sensible a S1 en pLS5 que en pLS1 (Fig. 24). Así, la horquilla III, eliminada en pLS5, puede ser contemplada como un competidor en la formación de la horquilla I, elemento esencial en el *ori*(+). ¿Cuál sería, entonces, el papel del putativo RNA I? No podemos olvidar que el posible promotor para la síntesis de este pequeño transcrito es consenso tanto en la secuencia de las cajas -35 (5'-TTGACA-3') y -10 (5'-TATAAT-3'), como en el espaciado entre ellas (18 pb) (Fig. 92). Es de esperar, por lo tanto, que exista una transcripción fuerte a partir de este promotor. El putativo RNA I podría terminar a nivel de la repetición inversa correspondiente a la horquilla III. Como se ha evidenciado recientemente (Wu y cols, 1988), el superenrollamiento local del DNA depende en gran medida de la transcripción, ya que el movimiento de la RNA polimerasa genera una onda de superenrollamiento positivo por delante del enzima, y otra de signo contrario por detrás. Así, la formación de estructuras cruciformes en el DNA estaría favorecida transitoriamente en el dominio negativo de la onda de superenrollamiento, y desfavorecida en el dominio positivo. Desde este punto de vista, la síntesis del RNA I podría tener un papel regulador en la formación de la horquilla III debido a la transcripción en sí misma, más que a la producción de una determinada especie de RNA. Esto significa que el efecto regulador debido a la síntesis del RNA I se produciría exclusivamente en *cis*, lo que explicaría que el clonaje de la región que codifica este RNA no produzca ningún efecto en *trans* sobre el número de copias de pLS5 o pLS1 (Fig. 82). La realización de experimentos que permitan analizar por separado la contribución de la síntesis del RNA I y de la formación de la horquilla III a la regulación de la replicación de pLS1, podría clarificar el fenotipo de doble número de copias de los plásmidos que carecen de esta región.

Una implicación general que se desprende del posible requerimiento de la

DNA, y se ve incrementada por la unión de RepC. En este trabajo, los autores afirman que la replicación de pT181 se inicia, exclusivamente, sobre DNA superenrollado. Esta afirmación la basan en los resultados de antiguos ensayos de replicación *in vitro* y, haciendo gala de una enorme flexibilidad de interpretación, consideran como prueba de inhibición de la síntesis de DNA por Nov los mismos datos que antes usaran para argumentar la falta de efecto de este antibiótico (Koepsel y cols, 1985b). Por otra parte, Noirot y cols (1990) describen en su último trabajo la existencia, en el DNA superenrollado de pT181, de otra estructura secundaria localizada en la región de control de copias. Esta estructura se forma con mayor frecuencia que la del origen, y constituye el principal sitio sensible a S1 en el DNA del plásmido silvestre. Los autores muestran también que un derivado que carece de la región de control (pT181*cop-608*) tiene incrementada la frecuencia de formación de la estructura cruciforme del origen, y es capaz de utilizar RepC con mayor eficiencia que el plásmido silvestre. La estructura secundaria en la región de control de copias del DNA de pT181 puede ser considerada, así, como un competidor de la estructura del origen (Noirot y cols, 1990), análogamente a lo que habíamos postulado para la horquilla III de pLS1.

Como acabamos de ver, la transitoriedad de la estructura cruciforme del origen y la influencia que otras regiones del DNA ejercen sobre su formación, pueden regular la tasa de iniciación de la replicación en pLS1 y, según parece ahora, también en pT181. El número de copias es una característica fija de cualquier plásmido bajo condiciones constantes, y está controlado por un sistema codificado por el propio plásmido que determina la tasa de iniciación de la replicación (Novick, 1987). Puesto que la replicación es un proceso potencialmente autocatalítico, los mecanismos plasmídicos de control deben utilizar la inhibición como principal estrategia reguladora (Novick, 1987). Aunque los procesos relativos a la formación de la horquilla I en el *ori*(+) de pLS1 pueden tener un importante papel biológico, no parece que sean capaces de "sentir" y corregir fluctuaciones en el número de copias. El verdadero control de la replicación y del número de copias recaería, en pLS1, sobre un mecanismo basado en el RNA II contratranscrito. Que este mecanismo es capaz de responder a incrementos en el número de copias lo demuestra la fuerte incompatibilidad frente a pLS1 causada por el clonaje de un fragmento de DNA que codifica tanto el RNA II como una parte del mRNA *repAB* que incluye la región complementaria al RNA II (posiblemente, la diana de acción de éste) (Fig. 81). La regulación de la expresión de un gen esencial para la replicación plasmídica por medio de un pequeño RNA complementario a una parte del mRNA es un mecanismo ampliamente conocido y descrito en plásmidos de bacterias tanto gram-negativas como gram-positivas (Thomas, 1988; Novick, 1987). La interacción del mRNA con su ctRNA

complementario impide la síntesis de la proteína de replicación, a través de una inhibición que tiene lugar a nivel transcripcional o postranscripcional (véase en la Introducción). Los sistemas estudiados hasta ahora presentan importantes estructuras secundarias, predichas por ordenador, tanto en el RNA inhibidor como en su diana de acción en el mRNA (Novick, 1987). Según se admite en general, la interacción entre ambas moléculas de RNA se inicia por apareamiento de bases entre regiones complementarias que se encuentran en los lazos de las respectivas estructuras secundarias (Novick, 1987). Aunque aún falta demostrar que la inhibición de la replicación de pLS1 causada por la presencia en *trans* de la región que codifica el RNA II se debe, realmente, a la interacción de este contratranscrito con la región complementaria del mRNA *repAB*, pensamos que éste sería el caso más lógico, y así lo vamos a asumir en esta Discusión. No obstante las supuestas similitudes funcionales con otros ctRNAs, el RNA II de pLS1 presenta unas características peculiares que podrían reflejar diferencias en su mecanismo de acción. Efectivamente, esta molécula tiene sólo unos 50 nts (según se desprende del análisis de secuencia y de los resultados de transcripción *in vitro*; Figs. 78 y 79), y sería el menor de los ctRNAs descritos hasta la fecha. Quizás condicionado por su pequeño tamaño, el RNA II no presentaría más apareamiento intracatenario que el correspondiente a su terminador (Fig. 79). Por su parte, la conformación estructural predicha para el mRNA *repAB* varía secuencialmente a medida que progresa la transcripción (no se muestra), aunque la estructura tallo-lazo complementaria a la del RNA II (estructura A en Fig. 98) permanecería invariable desde su formación. La configuración más estable para la región del mensajero entre los nucleótidos 790 a 905 se muestra en la Figura 98. Al contrario de lo que se postula para otros sistemas, la interacción entre la única estructura tallo-lazo del RNA II y la estructura A complementaria en el mRNA *repAB* no parece esencial, en el caso de pLS1, para la actuación del RNA II. Esto es, al menos, lo que se deduce de los resultados que muestran que el RNA II de tipo silvestre es aún activo frente a derivados cuyos mRNAs para RepB carecen de la estructura A (Figs. 86, 87 y 98). De estos resultados se deduce, asimismo, que la interacción entre el RNA II y su mRNA diana se podría producir por apareamiento de regiones complementarias de tan sólo 21 nts. En cuanto al nivel al que actúa el RNA II, el proceso inhibido podría ser la síntesis de RepB, ya que el extremo 5' del RNA II solapa con parte del a.r.b.s. (Fig. 98). En este sentido, el RNA II ejercería una inhibición directa, puesto que la señal bloqueada está incluida en su diana de acción. Una inhibición directa a nivel traduccional se ha postulado, también, como mecanismo de acción del ctRNA del plásmido de *Pseudomonas* R1162 (Kim y Meyer, 1986). En este caso, la secuencia que codifica para el ctRNA regulador (el cual presentaría una doble estructura tallo-lazo) solapa con el sitio de unión a los ribosomas y los dos primeros codones del gen para la proteína de replicación RepIA.

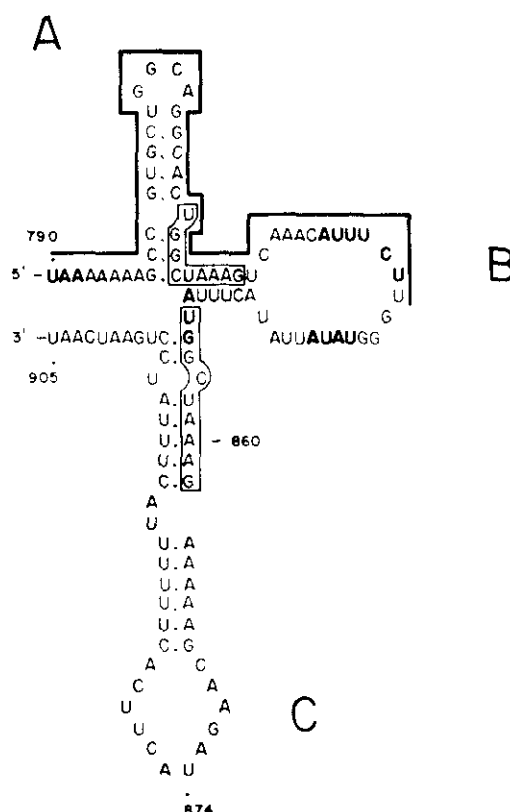


Figura 98. Posible estructura secundaria del mRNA *repAB* en la región 5' de *repB*. Se muestran las estructuras primaria y secundaria del mensajero entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 790 y 905. Tres estructuras tallo-lazo (A, B y C) son observables. Se muestran en negritas: el codón de terminación de la síntesis de RepA (UAA en 790), el a.r.b.s. de *repB* (AUUUCU...4 nts...UAUA), y el codón de iniciación de la síntesis de RepB (AUG en 853). Las dos regiones del mensajero afectadas por la repetición directa de 9 bases aparecen recuadradas. La línea continua por encima de la secuencia indica la región del mRNA *repAB* que interaccionaría con el RNA II por apareamiento de bases complementarias.

Tanto pLS1 como R1162 presentan otra característica común en el mecanismo postulado para la regulación de su número de copias por los respectivos ctRNAs: la localización del sitio de unión a los ribosomas en un lazo de la estructura secundaria del mensajero diana correspondiente (estructura B en Fig. 98). Esto sugiere que los ribosomas y los ctRNAs podrían competir por la unión a este sitio (Kim y Meyer, 1986). Así se explicaría que el RNA II de pLS1 pueda actuar sobre un mRNA que le es complementario en tan sólo 21 bases, que incluyen, eso sí, la mayor parte del a.r.b.s. (Fig. 98).

Una peculiaridad de pLS1 es la existencia de una repetición directa de 9 pb que afecta a dos regiones próximas del mRNA *repAB*, una de ellas incluida en la zona de solapamiento con el RNA II, y la otra a nivel de los primeros codones de *repB* (Fig. 98). A pesar de que cada una de estas repeticiones podría formar apareamientos intracatenarios con la región del mRNA complementaria a la otra repetición (Fig. 98),

no hemos encontrado que el mensajero pueda formar estructuras alternativas dependientes de la presencia o ausencia del RNA II, que den lugar, respectivamente, a un mRNA inactivo o activo para la síntesis de RepB. La existencia de conformaciones alternativas del mRNA *repAB* de pLS1 sería innecesaria si la interacción del RNA II produce, realmente, un bloqueo directo de la traducción. De ser así, el modelo de regulación del número de copias de pLS1 por ctRNA se alejaría del propuesto hasta ahora para otros plásmidos de bacterias gram-positivas, el cual se basa en un bloqueo indirecto, es decir, físicamente distante de la región de interacción (véase Introducción).

Ya que los miembros de la familia de pLS1 (pE194, pADB201 y pLB4) presentan una organización general similar y una homología significativa tanto a nivel de los *ori*(+) como a nivel de las proteínas Rep, es interesante conocer si la similitud se extiende también a los circuitos reguladores de la replicación. Para los plásmidos pADB201 y pLB4, recientemente descritos (Bergemann y cols, 1989; Bates y Gilbert, 1989), las únicas funciones asignadas lo han sido por homología con otros plásmidos (principalmente pLS1), y aún no se ha descrito la existencia de ctRNAs. Para pE194, se ha postulado y rechazado, sucesivamente, la regulación de la síntesis de RepF mediada por un ctRNA. Así, Villafane y cols (1987) describieron la existencia de un transcrito, de unos 350 nts, complementario al líder no traducido del mRNA *repF*. Estos autores propusieron que el ctRNA se iniciaría en una región justo adyacente al comienzo de la secuencia codificante de *repF*, y terminaría en una región palindrómica rica en G+C, localizada hacia la posición 880. Como ya vimos antes, la repetición inversa asignada como terminador resultó ser, sin embargo, una parte del *ori*(+) de pE194 (Dempsey y Dubnau, 1989), en concreto la región donde postulamos que se produciría el corte específico por RepF (Fig. 95). Por su parte, Byeon y Weisblum (1990) no encuentran ninguna evidencia experimental que apoye la existencia de un transcrito solapante con el mRNA *repF* y de orientación contraria. En este reciente trabajo, los autores cuestionan la existencia real de un ctRNA, y postulan que la regulación del número de copias de pE194 se realizaría, exclusivamente, a través de una proteína (Cop), cuya existencia había sido predicha por nosotros en base a su analogía con RepA de pLS1 (se verá más adelante). Sin embargo, buscando secuencias promotoras y terminadoras de la transcripción, hemos encontrado que tanto pE194 como los otros dos plásmidos de la familia de pLS1 (pADB201 y pLB4) podrían codificar pequeños transcritos complementarios al mRNA *rep* correspondiente (Fig. 99). Aunque no se observa homología de secuencia entre estos putativos ctRNAs y el RNA II de pLS1, sí existe una asombrosa similitud en lo que se refiere a la estructura general y a la localización relativa de las regiones que los codifican. En efecto, todos los promotores tendrían una caja -10

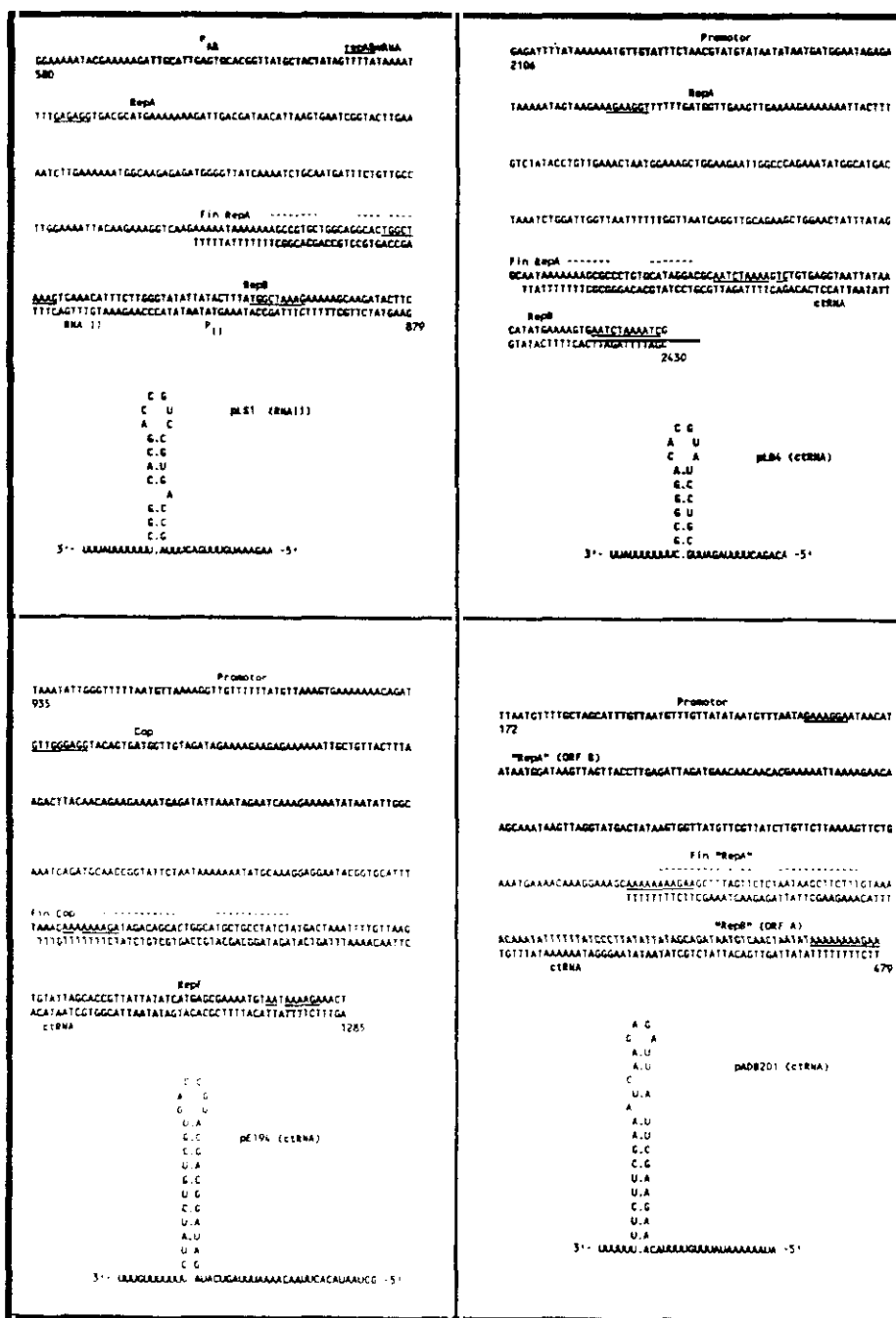


Figura 99. Comparación entre la región de control de replicación de pLS1 y las regiones análogas en otros plásmidos de su familia. En todos los plásmidos de esta familia se pueden encontrar elementos similares a los descritos para pLS1 y que, según proponemos, serían estructural y funcionalmente equivalentes a los de este plásmido: un promotor análogo a P_{AB}, implicado en la síntesis tanto de una pequeña proteína represora (similar a RepA) como de la proteína Rep del plásmido (equivalente a RepB); un promotor con la misma localización que P_{II}, a partir del cual se sintetizaría un pequeño ctRNA (tipo RNA II). Estos ctRNAs finalizarían en una estructura tallo-lazo con las características de los terminadores rho-independientes. La secuencia de DNA que daría lugar a esta estructura es una repetición inversa (líneas a trazos) localizada, en todos los plásmidos, en las inmediaciones del extremo 3' del gen tipo *repA*. La secuencia y estructura secundaria predicha para cada uno de los ctRNAs de esta familia se presenta debajo. Sobre la secuencia de DNA se indican también (en negritas): las putativas cajas -35 y -10 de los promotores tipo P_{AB}, los codones de iniciación y terminación de los genes análogos a *repA*, el codón donde se inicia la síntesis de las respectivas proteínas Rep, y la putativa caja -10 del promotor que dirige la síntesis del ctRNA. Para pLS1 y pE194 se señalan también las cajas -35 de este promotor. Subrayadas, se muestran las secuencias correspondientes al S.D. de los genes tipo *repA*, y a la repetición directa que afecta a dos zonas distintas de la región de control de cada uno de estos plásmidos. Las coordenadas que se muestran son las referidas por los autores mencionados en el pie de la Figura 95.

consenso (5'-TATAAT-3') y una caja -35 bastante infrecuente (tanto que no nos hemos atrevido a señalar una determinada secuencia, excepto para pE194, que fue propuesta por Villafane y cols (1987); Fig. 99). Además, el codón de iniciación de los respectivos genes *rep* se encuentra, invariablemente, entre las cajas -10 y -35 de los promotores para los ctRNAs. En cuanto al tamaño de los ctRNAs, en todos ellos se puede formar una estructura tallo-lazo que presenta una serie de Us en su extremo 3' (Fig. 99). Si, como ocurre para el RNA II de pLS1 (Figs. 78 y 79), estas estructuras funcionan como terminadores de la transcripción independientes de rho, los ctRNAs resultantes tendrían entre 40 y 70 nts de longitud. Visto sobre la secuencia de DNA de esta región de control, la terminación de los ctRNAs tendría lugar en las inmediaciones del codón de terminación del gen análogo a *repA* de pLS1 (se verá más adelante). Para representar la posible secuencia de los cuatro ctRNAs, hemos considerado la caja -10 predicha para cada promotor, y la región que hemos asignado en cada caso para la terminación. Al igual que en el RNA II de pLS1, la estructura de los ctRNAs de los otros tres miembros de la familia sería muy poco compleja y presentaría un único elemento tallo-lazo, correspondiente al terminador (Fig. 99). Por otra parte, una inspección del DNA en la región de control de cada uno de estos plásmidos, revela la existencia de una secuencia de 9 u 11 pb (distinta en cada caso), que se repite de forma directa en dos zonas próximas. Al igual que ocurre en pLS1, una de las repeticiones se encuentra en la región que determinaría el ctRNA, y la otra al principio de la secuencia codificante del gen *rep* correspondiente (Fig. 99).

La fuerte analogía entre el RNA II de pLS1 y los putativos ctRNAs de pE194, pADB201 y pLB4, nos sugiere que estos transcritos realmente existen y son funcionales en todos los miembros de esta familia. ¿Cómo se explica, entonces, que Byeon y Weisblum (1990) no hayan detectado el ctRNA de pE194 en una serie de experimentos diseñados para poner de manifiesto un transcrito de este tipo?. Hay que señalar que estos autores buscaban, en realidad, un transcrito de mayor tamaño (como el propuesto por Villafane y cols, 1987) que, comenzando a partir del promotor que también proponemos nosotros para la síntesis del ctRNA, terminara en el *ori*(+) del plásmido. Por esta razón, en los ensayos destinados a determinar la orientación y longitud de los transcritos sintetizados *in vivo* a partir de pE194, desestiman los resultados relativos a RNAs de pequeño tamaño, entre los cuales se encontraría el ctRNA que nosotros proponemos. En un segundo tipo de experimentos destinados a mapear los extremos 5' de los transcritos sintetizados *in vivo*, estos autores, en su búsqueda de un contratranscrito mayor, no utilizan ninguna sonda adecuada que presente la marca 5' terminal dentro de la región que codifica el ctRNA que proponemos. Nosotros postulamos, por lo tanto, que todos los miembros de la familia

de pLS1 utilizarían un mecanismo basado en ctRNAs para la regulación de la replicación y, así, del número de copias plasmídico. Dado que no existe homología de secuencia entre el RNA II de pLS1 y los ctRNAs de los otros plásmidos, nos atrevemos a predecir que pLS1 será compatible con todos ellos, y que cada uno de estos plásmidos pertenecerá a un grupo de incompatibilidad diferente. La única excepción la podría constituir, sin embargo, el par pE194 / pLB4 que comparte los sitios putativos de unión de las respectivas Rep en el *ori*(+). De ser así, no se trataría de incompatibilidad debida a un elemento regulador común, sino a orígenes funcionales de replicación compartidos.

A pesar del importante papel regulador del RNA II, éste no constituye el único control replicativo de pLS1. En efecto, en este trabajo hemos puesto de manifiesto la existencia de una pequeña proteína (RepA), codificada por pLS1, que autorregula la expresión del operón *repAB*. Este es el primer ejemplo de una proteína represora implicada en el control del número de copias plasmídico en bacterias gram-positivas. En plásmidos de bacterias gram-negativas, aunque las proteínas represoras de la expresión génica son consideradas como "una clase sorprendentemente pequeña dentro de los sistemas de control de la replicación", han sido caracterizadas en plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncFII (R1), IncP (RK2) e IncQ (RSF1010) (Thomas, 1988).

En pLS1, el producto del gen *repA* es un represor transcripcional que se une a una región que contiene un elemento simétrico de 13 pb (Figs. 70 y 71). Parte de la caja -35 del promotor P_{AB} está incluida en dicho elemento y contacta con RepA, la cual actúa como inhibidor de su propia síntesis por represión de este promotor (Figs. 65 y 66). Ya que la expresión de los genes *repA* y *repB* tiene lugar a partir del mismo promotor P_{AB} , la síntesis de la proteína RepB iniciadora de la replicación está también sometida al control por RepA. A juzgar por la información del banco de datos P.I.R., la proteína RepA, con sus 45 aminoácidos, es el represor más pequeño descrito hasta la fecha. Las predicciones de su estructura secundaria apuntan a la existencia de dos α hélices que configurarían el típico motivo α hélice-vuelta- α hélice presente en muchas proteínas que se unen a DNA (Pabo y Sauer, 1984). RepA comparte homología con una variedad de represores, incluyendo las proteínas Represor y Cro de los colifagos lambda y 434, y del fago P22 de *Salmonella* (Fig. 60). Por lo que sabemos, RepA ha sido el primer ejemplo (descrito en la literatura) de una proteína represora de origen plasmídico que contacta con un elemento simétrico. La simetría de los contactos entre RepA y el DNA de pLS1, unido a la estructura secundaria predicha para el represor plasmídico, crea una imagen que recuerda las interacciones de las proteínas Cro de los bacteriófagos lambda, 434 y P22 con sus respectivos operadores (Ptashne, 1986). Basándonos en estas similitudes,

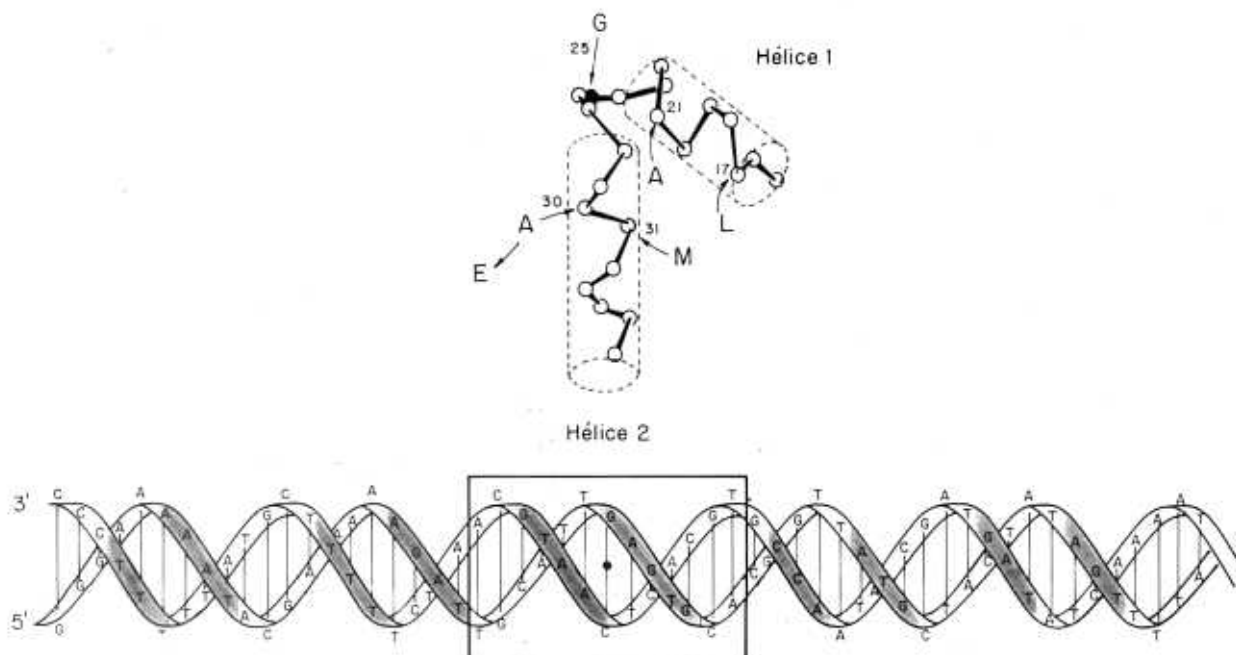


Figura 100. DNA diana de RepA y motivo de unión de la proteína. En la parte superior se muestra la representación esquemática de la subunidad bihelical de RepA, basada en la estructura propuesta para las proteínas Cro (Ptashne, 1986). Los residuos en las posiciones 21 y 31 podrían interaccionar para estabilizar las dos hélices. La Gly25 corresponde al residuo altamente conservado entre las proteínas con motivo α hélice-vuelta- α hélice (Fig. 60). Se indica la mutación *cop7* (Ala30 \rightarrow Glu), que produce un incremento de cinco veces en el número de copias del plásmido. En la parte inferior se presenta un diagrama esquemático de los contactos de RepA con su diana, en una representación de B-DNA (10.5 pb/vuelta de hélice). El elemento simétrico de 13 pb se ha recuadrado, y el centro de simetría se indica por un punto. Con esta representación, los contactos de RepA con el esqueleto del DNA (áreas sombreadas) caen sobre una cara de la hélice.

nos atrevemos a sugerir que la unidad bihelical de RepA tiene la estructura presentada en la Figura 100. La interacción entre los residuos Ala21 y Met31 podría ayudar a posicionar las dos hélices, tal y como ocurre en los represores Cro con los residuos correspondientes Ala e Ile (para Cro de λ y 434) o Ala y Val (para Cro de P22). En este sentido hay que señalar que las cadenas laterales de Met, Ile y Val son químicamente similares (Ptashne, 1986). Siguiendo con las posibles analogías, la α hélice-2 de RepA equivaldría a la α hélice-3 de las proteínas Cro, siendo, por lo tanto, la que contactaría con las bases del operador en el DNA de pLS1. La distribución de las bases cuyas desoxirribosas quedan protegidas por la unión de RepA en la región del operador se muestra en la Figura 100. Considerando una periodicidad helicoidal de 10.5 pb por

vuelta de hélice (Rhodes y Klug, 1980), es evidente que RepA contacta con el esqueleto del DNA sobre una sola cara de la hélice, y estas interacciones se extienden más allá del elemento simétrico de 13 pb (Fig. 100). De hecho, los contactos RepA-DNA se distribuyen a lo largo de una región de 48 pb (Fig. 70). Esta longitud parece excesiva si se compara con los 25 pb que, según Tullius y Dombroski (1986), cubre un dímero del Represor de lambda unido a un fragmento de DNA que contiene el operador O_R1 . La comparación resulta aún más chocante si se tiene en cuenta la diferencia de tamaño entre las proteínas RepA (45 aminoácidos) y Represor de lambda (236 aminoácidos). No obstante, una inspección de las figuras 3 y 4 del trabajo de Tullius y Dombroski (1986) nos indica que pueden existir, al menos, otras dos regiones protegidas (no consideradas por los autores), que se encontrarían más alejadas del eje de simetría del O_R1 y que, por lo tanto, incrementarían la longitud del DNA contactado por el represor fágico. Sea como fuere, Tullius y Dombroski (1986) consideran que la extensión de los contactos Represor de lambda-DNA definida por ellos (25 pb) es, todavía, excesiva para adaptarse a un modelo que usa B-DNA recto y un dímero del Represor con la estructura encontrada en los cristales de la proteína. Según los mismos autores, el doblamiento del DNA (que ya se había sugerido para los complejos Cro de lambda-DNA y Represor de 434-DNA), o un cambio en los contactos proteína-proteína en el dímero del Represor de lambda, podrían permitir la interacción entre la proteína y el DNA en sitios alejados del eje de simetría del operador. En el DNA de pLS1 existe una curvatura dependiente de secuencia en una región que incluye la diana de RepA (Pérez-Martín y cols, 1988). Además, la unión de la proteína produce en el DNA un fuerte doblamiento centrado en esta región (Pérez-Martín y cols, 1989). Este doblamiento inducido podría incrementar la longitud del DNA protegido por RepA y ser, así, responsable de la atenuación de la rotura por radical hidroxilo en las regiones más externas (Figs. 68 a 71), tal y como acabamos de ver que se ha propuesto para el complejo Represor de lambda-DNA (Tullius y Dombroski, 1986). De este modo, las regiones protegidas más externas se deberían al "sombreado" del esqueleto de DNA por la proteína unida, más que a un contacto físico directo RepA-DNA. De ser así, la región cubierta realmente por RepA se extendería como máximo 28 pb (región entre las áreas de contacto c y c' de una y otra cadena; Fig. 70). Este supuesto explicaría, además, que la atenuación de la rotura del esqueleto de DNA sea menor en las regiones d/d' y e/e' que en el resto (Figs. 68 a 70). Sin embargo, en la actualidad no podemos discriminar si las regiones protegidas más externas son debidas a "sombreado" o a unión adicional de RepA de una forma altamente cooperativa a partir del complejo inicial. En este punto cabría plantearse si la unión de RepA depende sólo del elemento simétrico de 13 pb (en cuyo caso éste sería por sí mismo el operador), o si, por el contrario, las secuencias adyacentes juegan también un importante papel en el

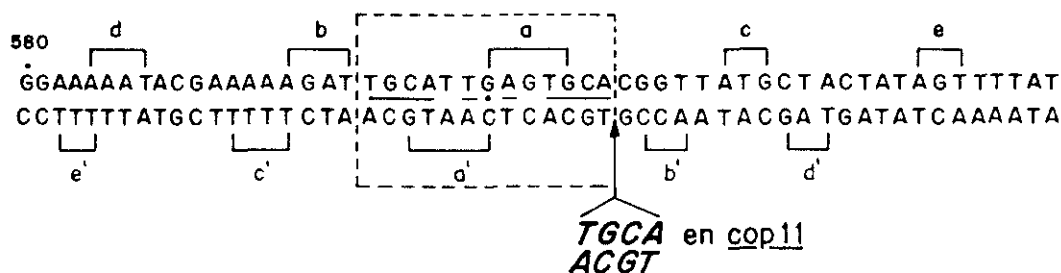


Figura 101. Posición de la mutación *cop11* relativa a los contactos RepA-operador silvestre. Se presenta la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas entre las coordenadas 580 y 634 del DNA de pLS1. Las regiones protegidas por RepA frente a la acción del radical hidroxilo se muestran en corchetes (a-e y a'-e'). El elemento simétrico de 13 pb se muestra recuadrado, con las bases palindrómicas subrayadas y el centro de simetría señalado por un punto. La mutación *cop11* conlleva la inserción de 4 pb adyacente al extremo derecho del elemento simétrico.

reconocimiento de la proteína por su DNA diana. Aunque el clonaje (ya en marcha) del elemento simétrico separado de las regiones vecinas del DNA de pLS1 nos dará una respuesta más clara acerca de la secuencia específica para la unión de RepA, disponemos de algunas indicaciones experimentales que pueden arrojar alguna luz sobre esta cuestión. Así, RepA es capaz de inhibir *in vitro* de forma específica la actividad del promotor P_{AB} del plásmido mutante pLS5*cop11*, el cual tiene intacto el elemento simétrico pero presenta una inserción de 4 pb justo a continuación (Figs. 66 y 101). Estos resultados demuestran que RepA puede reconocer su sitio de unión aunque la secuencia de las regiones de contacto b', c, d' y e se hayan alejado del elemento de simetría (Fig. 101). Por otra parte, RepA se une a un DNA que presenta el elemento simétrico de 13 pb y las regiones de contacto corriente arriba de éste (b, c', d y e'), pero cuya secuencia corriente abajo del elemento ha sido completamente alterada (Pérez-Martín y Espinosa, 1991). Estos resultados, junto con la posición central del elemento simétrico de 13 pb en la región total protegida por RepA (Figs. 68 a 71), nos hacen pensar que dicho elemento es realmente el operador de RepA.

Tal y como ocurre con el resto de los elementos relacionados con la replicación a partir del *ori*(+), una inspección del DNA de los plásmidos de la familia de pLS1 revela que en todos ellos existe una pequeña *orf* localizada delante del inicio de la secuencia codificante del correspondiente gen *rep*. Las putativas proteínas especificadas por estas *orfs* tienen un tamaño ligeramente superior al de RepA (52 aminoácidos para las proteínas de pLB4 y pADB201, y 55 aminoácidos para la de pE194). La comparación de las proteínas tipo RepA de esta familia de plásmidos revela un cierto grado de homología,

	hélice 1	hélice 2
	-----	-----
	5	9
pLS1 (RepA)	MKKRLTITLSESVLENLEKMAREMGLSKSAMISVALENYKKGQEK	
pE194 (Cop)	MVVDRKEEKKVAVTLRLTTEENEILNRIKEKYNISKSDATGILIKKYAKEEYGAF	
pADB201 (ORF B)	MDKLVTLLRLDEQQHEKLKEQANKLGMTISGYVRYLVLKSSEMKTESKKKKL	
pLB4 (RepA)	MVEVEKKKITLSIPVETNGKLEELAQKYGMTKSGLVNFLVNQVAEAGTIYRQ	

Figura 102. Alineamiento de las proteínas tipo RepA de los plásmidos de la familia de pLS1. Las proteínas fueron alineadas por sus putativos motivos α hélice-vuelta- α hélice, presentándose la secuencia entera de aminoácidos. La existencia de ORF B de pADB201 aún no ha sido confirmada; los polipéptidos Cop de pE194 (Byeon y Weisblum, 1990), y RepA de pLB4 (Bates y Gilbert, 1989) han sido visualizados.

aunque no existen regiones con considerable identidad de secuencia (Fig. 102). La mayor similitud se daría, no obstante, a nivel estructural, donde se cumplen los requerimientos propuestos por Ohlendorf y cols (1983) para los motivos α hélice-vuelta- α hélice de unión a DNA. Sin embargo, la proteína tipo RepA de pE194 no presenta los residuos Ala (en posición relativa 5) y Gly (en posición 9) altamente conservados en dicho motivo. Así, un residuo Asn sustituye a la Gly conservada, como ocurre también en el Represor de ϕ 105 (Figs. 60 y 102) y en una serie de proteínas de reconocido motivo α hélice-vuelta- α hélice (Dodd y Egan, 1990). Lo mismo sucede con la posición relativa 5, ocupada en la proteína de pE194 por una Lys, residuo que también aparece en idéntica situación en el Represor del Trp (Figs. 60 y 102). Por otra parte, tal y como ocurre en pLS1, los demás miembros de esta familia también presentan en su DNA secuencias palindrómicas, en general imperfectas (salvo la de pADB201, que es perfecta), solapantes o adyacentes a la caja -35 del putativo promotor del gen *rep* correspondiente. Estos palíndromes tienen un tamaño variable (siendo de 8 pb el de pADB201, de 13 pb el de pLB4 y de 14 pb el de pE194), y exhiben asimismo una heterogeneidad de secuencia. Dichos palíndromes podrían constituir los elementos de simetría para el reconocimiento del DNA diana por las correspondientes proteínas tipo RepA. Todas estas similitudes nos llevaron a proponer que todos los miembros de la familia de pLS1 presentarían una proteína estructural y funcionalmente análoga a RepA, por lo que la existencia de proteínas que regulan la síntesis de un factor requerido para la replicación sería un fenómeno más extendido de lo que se pensaba (Thomas, 1988). Estas predicciones parecen confirmarse para pE194 a juzgar por los resultados preliminares del trabajo de Byeon y Weisblum (1990), mencionado anteriormente. Los autores muestran que minicélulas de *B. subtilis* conteniendo pE194 sintetizan una proteína (Cop) que presenta el tamaño esperado por nuestra predicción (Fig. 102). Además, mutaciones de copia que se habían atribuido previamente a alteraciones en un largo ctRNA (Villafane y cols, 1987; véase antes en la Discusión),

afectarían en realidad a la proteína Cop (Byeon y Weisblum, 1990). Los autores atribuyen a la proteína Cop de pE194 una función similar a la de RepA de pLS1 y proponen, creemos que erróneamente, que la regulación de la replicación de pE194 se realizaría exclusivamente a través de Cop. Como ya hemos comentado, nosotros pensamos que en el control del número de copias de este plásmido de estafilococos intervendría también un pequeño ctRNA (Fig. 99).

In vivo, la represión por RepA del promotor P_{AB} de pLS1 está evidentemente relacionada con la regulación de la replicación, ya que plásmidos portadores de la mutación *cop7* (que afecta al gen *repA*) presentan un número de copias superior al del plásmido silvestre (Fig. 77) y determinan una mayor concentración celular de mRNA *repAB* (Fig. 37). Además, *cop7* se comporta como una mutación recesiva, ya que el fenotipo del plásmido mutante es revertido por la presencia del gen silvestre en *trans* (Fig. 77). Este comportamiento es el esperado para una alteración que afecte a un represor difusible, capaz de actuar en *trans*. La mutación *cop7* determina el cambio A30 → E (Fig. 100) dentro de la αhélice-2 de RepA, que se supone la hélice de reconocimiento que encajaría en el surco mayor del DNA. La sustitución de un aminoácido hidrofóbico por otro cargado negativamente podría dificultar la unión de RepA al DNA, aún cuando el residuo alterado (posición relativa 14 del motivo αhélice-vuelta-αhélice) no sea uno de los que supuestamente interaccionan de forma directa con las bases apareadas del DNA. Alternativamente, la sustitución de un aminoácido por otro químicamente tan distinto podría afectar a la configuración final de la proteína y, así, a su actividad.

El gen *repA* no es esencial para pLS1 y, de hecho, puede ser eliminado por completo sin afectar la capacidad de replicación y mantenimiento del plásmido. Al contrario de lo que ocurre con el RNA II, un incremento en la dosis del gen *repA* (cuando éste es clonado en un replicón compatible bajo el control de su propio promotor) no produce incompatibilidad ni disminuye de forma significativa el número de copias de pLS1 (Fig. 77). Así, RepA por sí sola no parece capaz de corregir de forma eficiente fluctuaciones en el número de copias plasmídico, debido sin duda a su capacidad de autorregulación. En algunos de estos aspectos el gen *repA* de pLS1 se asemeja a *copB* de R1. Así, la delección de *copB* da lugar a un plásmido que presenta un elevado número de copias y que es extremadamente sensible a la presencia de actividad CopB (Nordström y Nordström, 1985). Además, la adición de un gen *copB* clonado no afecta la replicación del plásmido silvestre (Nordström y Nordström, 1985). Sin embargo, entre ambos represores plasmídicos (RepA y CopB) existen importantes diferencias funcionales que podrían reflejar características específicas de los replicones que los codifican (pLS1 y R1,

respectivamente). La principal diferencia estriba en que la proteína CopB de R1 no se autorregula, sino que reprime un segundo promotor para el gen *repA* (cuyo producto es necesario para la replicación del plásmido, véase Introducción). El promotor sensible a CopB está totalmente reprimido cuando R1 replica en condiciones normales y sólo se activa si el número de copias plasmídico cae de forma alarmante. Esto permite una rápida autocorrección a través de un incremento en la transcripción de *repA*. CopB representa, pues, un mecanismo regulador secundario de especial importancia para un plásmido (como R1) que presenta un bajo número de copias, cuya disminución puede ser desastrosa (Novick, 1987). Por el contrario, el promotor P_{AB} de pLS1 nunca llega a estar totalmente reprimido por RepA y, de hecho, el único mensajero *repB* observado *in vivo*, tanto en células que contienen pLS1*cop7* como en las que llevan pLS1, se inicia a partir de dicho promotor (Fig. 37). La actividad permanente del promotor P_{AB} es imputable al circuito autorregulador de RepA, el cual mantendría los niveles de esta proteína represora dentro de unos límites.

Los ensayos de transcripción *in vitro* utilizando la RNA polimerasa de *E.coli* muestran que, en ausencia de RepA, el promotor P_{AB} tiene una fuerza considerable, al menos cuando se compara con el promotor P_{II} (a partir del cual se sintetiza el RNA II). Efectivamente, la cuantificación de la radiactividad incorporada al RNA II y al RNA sintetizado a partir de P_{AB} (teniendo en cuenta el número de residuos U de ambos transcritos) indica que el promotor P_{AB} tendría una actividad unas dos veces superior a la de P_{II} (Figs. 65 y 78). Así, con las reservas con que los resultados *in vitro* pueden extrapolarse para sacar conclusiones *in vivo*, la tasa de síntesis del mRNA *repAB* en células de pneumococos que tengan el promotor P_{AB} desreprimido podría ser mayor que la del RNA II, al contrario de lo que se ha propuesto para otros replicones (Novick, 1987). ¿Cuál podría ser el significado biológico de un promotor intrínsecamente fuerte, que dirige la transcripción del gen *rep*, y que es reprimido por el producto de otro de los genes bajo su control?. Puede ser crítico para un plásmido naturalmente transmisible (como pMV158, del que deriva pLS1) el poder contar con una tasa inicialmente alta de transcripción a partir de su promotor *rep* cuando coloniza un nuevo huésped. En este sentido, una proteína represora (RepA) podría jugar un papel clave limitando la actividad del promotor *rep* sólo cuando se haya alcanzado un cierto número de copias plasmídico. Así, si bien el 100% de actividad del promotor P_{AB} de pLS1 se requeriría sólo para el establecimiento o en caso de que el número de copias fuera alarmantemente bajo, una actividad parcial de dicho promotor se mantendría en condiciones normales para permitir la replicación del plásmido. Esto constituye otra diferencia con el mecanismo regulador que opera en R1, donde el promotor sensible a CopB sólo es activo en caso de una

importante bajada en el número de copias, en tanto que el resto del tiempo permanece callado por acción de la proteína represora (Nordström y Nordström, 1985). La importancia que la actividad "a tope" del promotor P_{AB} de pLS1 puede tener en el establecimiento inicial del plásmido viene reforzada por la diferente capacidad de transformación observada para pLS5 y pLS5*cop11*. En efecto, en tanto que el número de copias del plásmido que lleva la mutación *cop11* es incluso ligeramente superior, la eficiencia con la que su DNA es transferido a pneumococos sin plásmido es 2 o 3 veces inferior a la de pLS5. La consecuencia de la mutación *cop11* es una disminución de la fuerza de P_{AB} , tan marcada que hemos sido incapaces de detectar *in vivo* ningún transcrito que se inicie a partir de este promotor, y por transcripción *in vitro* se observa una débil actividad del mismo (Figs. 66 y 78). De esta forma, la diferente eficiencia de transformación de plásmidos con P_{AB} silvestre y mutante sugeriría que para la colonización de un nuevo huésped es más funcional que el plásmido cuente con una actividad inicial fuerte de P_{AB} seguida de un cierto nivel de represión, en lugar de empezar con una baja tasa de transcripción aunque seguida por una menor represión por RepA.

Es posible que el mecanismo general de control de la replicación de pLS1 no consista en dos circuitos reguladores separados, sino más bien en un único circuito donde actúen conjuntamente RepA y RNA II. Debido a su capacidad de autorregulación, la proteína RepA podría encargarse de mantener los niveles de mRNA *repAB* dentro de unos límites. Por su parte, el RNA II se sintetizaría constitutivamente, por lo que su concentración sería proporcional al número de copias del plásmido. Así, niveles variables (y dependientes del número de copias) del RNA inhibidor actuarían sobre una concentración más constante de mRNA diana, permitiendo, quizás, una regulación más eficaz. Un esquema del mecanismo general que podría funcionar en pLS1 para el control del número de copias, y que resume el trabajo realizado en esta Tesis, se muestra en la Figura 103. Ya que en los demás miembros de la familia de pLS1 existen elementos análogos al RNA II y a RepA, podemos postular para todos ellos un mecanismo de acción conjunta de proteína represora y ctRNA para la regulación de la replicación.

Desde el punto de vista evolutivo, no deja de ser sorprendente la fuerte analogía que existe entre los miembros de la familia de pLS1 a nivel de los elementos implicados en la iniciación de la cadena líder y en su regulación (Figs. 95, 96, 99 y 102). Esta analogía es aún más intrigante si se tiene en cuenta que los distintos plásmidos fueron aislados a partir de diferentes huéspedes y en distintos continentes: pMV158 (del que deriva pLS1) de *S.agalactiae*, en América (Burdett, 1980); pE194 de *S.aureus*, en Europa (Iordanescu, 1976); pLB4 de *L.plantarum*, también en Europa (Bates y Gilbert,

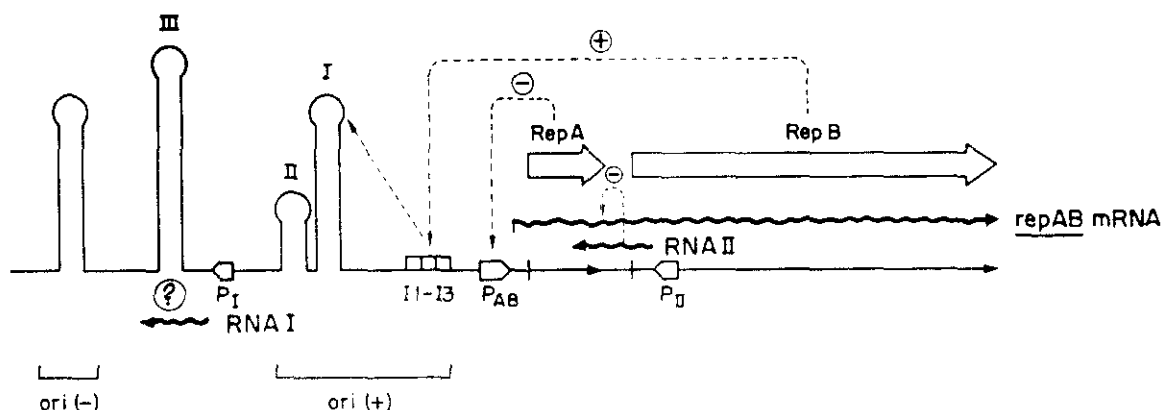


Figura 103. Regulación de la replicación de pLS1: esquema derivado de los resultados presentados en esta Tesis. Se muestra el replicón básico de pLS1, con los circuitos de control mediados por RepB (regulación positiva), y por RepA y RNA II (regulación negativa). El papel del RNA I y/o de la horquilla III no están aún totalmente claros.

1989); y pADB201 de *M. mycoides*, en Australia (Bergemann y Finch, 1988). El alto grado de conservación, patente a nivel tanto del DNA en la región del *ori*(+) como de las proteínas Rep, contrasta con la carencia de homología a nivel del origen de la cadena retrasada. En efecto, de entre los miembros de esta familia, sólo pE194 presenta la homología ya mostrada (Fig. 33) con el *ori*(-) de pLS1 y con el elemento RS_B adyacente. En los otros dos plásmidos (pADB201 y pLB4), no hemos encontrado secuencias similares a ninguno de estos elementos de pLS1. En tanto que el alto grado de conservación a nivel de los elementos relativos al *ori*(+) sugiere que los miembros de la familia de pLS1 tienen un ancestro común, la divergencia en la señal de conversión de ssDNA a dsDNA reflejaría los requerimientos específicos de los distintos huéspedes. La conservación de las regiones homólogas estaría favorecida porque la especificidad en la iniciación de la síntesis de la cadena líder recaería totalmente en funciones y elementos plasmídicos, y no dependería de proteínas del huésped (que actuarían a partir de un complejo de iniciación ya formado). Por el contrario, la especificidad de reconocimiento del *ori*(-) recaería sobre funciones del huésped, lo que explicaría que en cada especie se hubieran adoptado las señales de conversión más eficientes (diferentes entre sí). Todo esto parece corroborar el concepto introducido por Novick (1989) de que los plásmidos de bacterias gram-positivas están contruidos a base de "módulos", los cuales se presentan combinados de forma diferente en los distintos plásmidos. Efectivamente, varios elementos de secuencia son compartidos por miembros de diferentes familias, pero no por todos los miembros de un determinado grupo. Así, hemos visto (Fig. 33) que el *ori*(-) de pLS1 tiene homología con los elementos *pala* de plásmidos tanto de su propia familia (pE194), como de otras

familias (pC194, pC221). Por otro lado, en lo que respecta al determinante de resistencia a Tc, existe una considerable homología entre pLS1 y pT181 (a nivel de DNA, la proporción de bases idénticas en la secuencia codificante del gen *tet* de uno y otro plásmido es de un 69%; Lacks y cols, 1986). Adoptando la idea de Novick, podemos considerar que pLS1 está constituido por tres bloques o módulos bien definidos: uno de ellos comprendería las funciones relativas al *ori*(+), otro lo constituiría el *ori*(-) y un tercero sería el determinante de resistencia al antibiótico. En pMV158 existe, además, un cuarto módulo que incluye la región *pre/mob* (para la transferencia conjugativa del plásmido) y la señal de conversión BA3 (eficientemente reconocida en *B.subtilis*). Este módulo, eliminado en pLS1, tiene sus homólogos en los plásmidos pUB110 de *S.aureus* y pTB913 de una especie termofílica de *Bacillus* (van der Lelie y cols, 1989). La posibilidad que parecen tener todos estos plásmidos de bacterias gram-positivas para intercambiar módulos entre sí permite una gran versatilidad, ya que los módulos pueden combinarse de muy distintas maneras. Este intercambio estaría facilitado por el mecanismo de replicación tipo círculo rodante utilizado por estos plásmidos, durante el cual se genera DNA monocatenario altamente recombinogénico (Michel y Ehrlich, 1986a y 1986b). No es de extrañar, por tanto, que estos plásmidos sean potentes elementos de dispersión genética horizontal, y que con toda propiedad se hayan denominado "plásmidos promiscuos".

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Esta Tesis recoge gran parte de la información que existe actualmente sobre la replicación y regulación de número de copias de pLS1, plásmido capaz de establecerse y mantenerse de forma autónoma tanto en bacterias gram-positivas como en el huésped gram-negativo *E.coli*

Aprovechando la capacidad de pLS1 para replicar en *E.coli*, hemos puesto a punto un sistema *in vitro*, basado en extractos libres de células de esta bacteria, para comenzar el estudio de las características replicativas del plásmido. En estos ensayos se estableció, entre otras cosas, el requerimiento de proteínas especificadas por el plásmido para su replicación. También se apuntaba la necesidad de un DNA superenrollado como sustrato de la replicación.

Distintas líneas de evidencia, aquí presentadas, muestran que pLS1 replica mediante un mecanismo de círculo rodante asimétrico, y que este mecanismo es el utilizado en las tres especies bacterianas analizadas: *S.pneumoniae*, *B.subtilis* y *E.coli*.

Se demuestra la existencia de una señal, eficientemente reconocida en *S.pneumoniae*, para la conversión de ssDNA en dsDNA. Dicha señal consistiría en una estructura secundaria formada por una larga e imperfecta repetición inversa. En el lazo de la estructura hemos localizado una secuencia de 6 bases que se conserva en una serie de plásmidos de *S.aureus* que, junto con pLS1, formarían parte de la misma familia en cuanto al *ori*(-). En pneumococos, la eliminación de esta señal de conversión, aunque no impide la replicación del plásmido, produce una disminución en el número de copias (dsDNA), una gran acumulación de ssDNA, y la desestabilización de la herencia del plásmido.

Hemos determinado, tanto *in vivo* (en células de *S.pneumoniae*) como *in vitro* (en el sistema de *E.coli*), la dirección de síntesis de la cadena líder de pLS1, que ha resultado ser idéntica a la dirección de síntesis de los mRNAs plasmídicos.

Hemos localizado, *in vivo* e *in vitro*, el origen de la cadena líder de pLS1 [*ori*(+)]. Mientras que el origen funcional ha sido delimitado *in vivo*, la localización del

sitio de iniciación de la replicación ha sido mapeada *in vitro*. En el *ori*(+) de pLS1 existen dos importantes elementos de secuencia: las dos repeticiones inversas que podrían dar lugar a las horquillas I y II, y los tres iterones del plásmido. La formación de una estructura secundaria (probablemente correspondiente a la horquilla I) en el DNA superenrollado de pLS1 ha sido demostrada *in vitro*. El modelo por nosotros propuesto considera a la horquilla I como un elemento fundamental del *ori*(+) de pLS1, que podría dar cuenta del requerimiento de un sustrato superenrollado para la replicación. Este modelo se ha visto apoyado recientemente al comprobarse que la horquilla I incluye el sitio donde la proteína RepB introduce el corte específico para la iniciación de la replicación. El modelo postula también que los iterones, físicamente alejados de la horquilla I, constituyen el sitio de reconocimiento y unión de RepB. Esta predicción también ha sido ya confirmada. En el trabajo se discute, asimismo, el posible papel regulador de la horquilla III (cuya formación podría competir con la de la horquilla I) y del putativo RNA I (cuya síntesis podría modular la formación de la horquilla III).

Se ha puesto a punto un procedimiento de purificación de la proteína iniciadora RepB. La proteína pura tiene actividad tipo topoisomerasa específica de pLS1.

Se establece que el control de la replicación de pLS1 (y, por tanto, de su número de copias) es ejercido por dos inhibidores: la proteína RepA y el ctRNA (RNA II). Estos elementos no actuarían por separado, sino que formarían parte de un mismo circuito regulador.

La proteína reguladora RepA ha sido purificada y caracterizada con cierta profundidad. Las predicciones de estructura secundaria y la secuencia de aminoácidos de la proteína indican la existencia de un motivo α hélice-vuelta- α hélice para la unión a DNA. En cuanto a su función, RepA es un represor transcripcional de su síntesis y de la de RepB. *In vivo*, RepA modula el número de copias de pLS1, habiéndose caracterizado una mutación que afecta al motivo de unión a DNA y que determina un elevado número de copias plasmídico. El gen *repA* es dispensable para pLS1, y su delección no conduce a la pérdida de estabilidad plasmídica en pneumococos. La diana de RepA ha sido localizada en una región que solapa con el promotor P_{AB} , el cual dirige la síntesis del mRNA *repAB*. La proteína contacta con el esqueleto del DNA por una sola cara de la doble hélice. En el centro de la región contactada por RepA existe un elemento simétrico de 13 pb que es considerado como el operador. RepA es el primer represor transcripcional descrito en un plásmido de bacterias gram-positivas, y el más pequeño de todos los represores estudiados hasta la fecha.

La existencia de un ctRNA (RNA II) implicado en el control de la replicación de pLS1 ha sido establecida. La región que codifica este ctRNA constituye el principal determinante de incompatibilidad de pLS1. El tamaño del RNA II (deducido de los datos de secuencia y de los resultados de ensayos de transcripción *in vitro*) es el menor descrito hasta el momento para un ctRNA inhibidor. Su estructura secundaria parece ser muy simple, presentando un único tallo-lazo que funcionaría como un terminador muy eficiente. Se postula un modelo de inhibición directa para este ctRNA, basado en el bloqueo del a.r.b.s. de *repB* por apareamiento de bases complementarias entre mRNA y RNA II. Para que este bloqueo tenga lugar no sería necesaria la interacción entre la única estructura tallo-lazo predicha en el RNA II y la estructura complementaria en el mRNA *repAB*.

En lo que se refiere a la síntesis de la cadena líder y a su regulación, hemos establecido una nueva familia de plásmidos de bacterias gram-positivas, en la que pLS1 sería el prototipo (como plásmido mejor conocido). La familia incluye, además, los plásmidos pE194 de *S.aureus*, pADB201 de *M.mycoides*, y pLB4 de *L.plantarum*, uno sólo de los cuales (pE194) presenta también homología con pLS1 en cuanto al *ori(-)*. Los miembros de esta familia presentan una secuencia de DNA altamente conservada en la región donde las respectivas proteínas Rep introducirían el corte iniciador de la replicación. Sin embargo, a excepción del par pE194/pLB4, no existe entre ellos homología en los iterones (que serían, por analogía con RepB, los sitios de unión de la proteína iniciadora). Paralelamente, las proteínas Rep de los plásmidos de esta familia exhiben gran homología en la región N-terminal, pero no en la C-terminal, de nuevo exceptuando las proteínas de pE194 y pLB4, cuya homología se extiende a todas las regiones. Esto nos ha permitido sugerir que el dominio de unión específica a DNA se encuentra en la región C-terminal de las Rep. De otra parte, la demostración de la función de RepA como regulador de la replicación de pLS1 nos llevó a postular la existencia de proteínas con una función análoga en los plásmidos de esta familia. Hemos detectado la existencia de *orfs* con la misma localización genética que *repA* de pLS1, y que podrían determinar proteínas estructuralmente similares a RepA. Recientemente una de estas proteínas ha sido identificada en pE194, aunque en nuestra opinión, su papel como único regulador de la replicación plasmídica ha sido sobreinterpretado. Finalmente, todos los miembros de la familia presentan una región con estructura y organización genética similares a la región de pLS1 que codifica el RNA II. Además, los putativos ctRNAs codificados por estos plásmidos presentarían características análogas al RNA II de pLS1 en lo que se refiere a tamaño y estructura. Nuestra propuesta, aún sin confirmar,

es la existencia de tales ctRNAs con función en la regulación de la replicación en todos los miembros de la familia de pLS1.

Nota añadida en el último momento: Acaba de ser caracterizado un plásmido de *Helicobacter pylori* (bacteria gram-negativa) que parece replicar vía círculo rodante. Este plásmido presenta homología con los de la familia de pLS1 en la región de DNA donde las proteínas Rep producen el corte específico. También existe homología significativa entre la putativa Rep de este plásmido y las correspondientes a la familia de pLS1. Una larga e imperfecta repetición inversa ha sido localizada también en el plásmido de *H.pylori* que podría dar lugar a una estructura tallo-lazo que presentaría en el extremo desapareado la consenso de seis bases modificada que aparece, en idéntica posición, en el *ori(-)* de pE194.

BIBLIOGRAFIA

Aiba,H., Adhya,S. and de Crombrugghe,B. (1981). Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J.Biol.Chem.* 256: 11905-11910.

Baas,P.D. (1985). DNA replication of single-stranded *Escherichia coli* DNA phages. *Biochim.Biophys.Acta* 825: 111-139.

Ballester,S., López,P., Alonso,J.C., Espinosa,M. and Lacks,S.A. (1986). Selective advantage of deletions enhancing chloramphenicol acetyltransferase gene expression in *Streptococcus pneumoniae* plasmids. *Gene* 41: 153-163.

Ballester,S., López,P., Espinosa,M., Alonso,J.C. and Lacks,S.A. (1989). Plasmid structural instability associated with pC194 replication functions. *J.Bacteriol.* 171: 2271-2277.

Ballester,S., Alonso,J.C., López,P. and Espinosa,M. (1990). Comparative expression of the pC194 *cat* gene in *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 86: 71-79.

Bates,E.E.M. and Gilbert,H.J. (1989). Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Gene* 85: 253-258.

Bennett,J. and Scott,K.J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal.Biochem.* 43: 173-182.

Bergemann,A.D. and Finch,L.R. (1988). Isolation and restriction endonuclease analysis of a mycoplasma plasmid. *Plasmid* 19: 68-70.

Bergemann,A.D., Whitley,J.C. and Finch,L.R. (1989). Homology of mycoplasma plasmid pADB201 and staphylococcal plasmid pE194. *J.Bacteriol.* 171: 593-595.

Berzal,A. (1990). RNA "antisense" en el control de la replicación del plásmido R1: identificación de nuevas secuencias que modulan su acción. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Birboim,H.C. and Doly,S. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl.Acids Res.* 7: 1513-1528.

Blomberg,P., Wagner,E.G.H. and Nordström,K. (1990). Control of replication of plasmid R1: the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically *in vivo* and *in vitro* by RNase III. *EMBO J.* 9: 2331-2340.

Boes,L., Gros,M., te Riele,H., Ehrlich,S.D. and Gruss,A. (1989). Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *J.Bacteriol.* 171: 3366-3372.

Bramhill,D. and Kornberg,A. (1988). A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54: 915-918.

Burdett,V. (1980). Identification of tetracycline resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (Group B). *Antimicrob.Agents Chemother.* 18: 753-760.

Burdett,V., Inamine,J. and Rajagopalan,S. (1982). Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*. J.Bacteriol. 149: 995-1004.

Burdett,V. (1986). Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein synthesis. J.Bacteriol. 165: 564-569.

Byeon,W.-H. and Weisblum,B. (1990). Replication genes of plasmid pE194 -*cop* and *repF*: transcripts and encoded proteins. J.Bacteriol. 172: 5892-5900.

Castagnoli,L., Lacatena,R.M. and Cesareni,G. (1985). Analysis of dominant copy number mutants of the plasmid pMB1. Nucl.Acids Res. 13: 5353-5367.

Chattoraj,K.K., Snyder,K.M. and Abeles,A.L. (1985). P1 plasmid replication: multiple functions of RepA protein at the origin. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82: 2588-2592.

Chou,P.Y. and Fasman,G.D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv.Enzimol. 47: 45-147.

Clewell,D.B., Evenchik,B. and Cranston,J.W. (1972). Direct inhibition of ColE1 plasmid DNA replication in *Escherichia coli* by rifampicin. Nature 237: 29-31.

Colasanti,J. and Denhart,D.T. (1987). Mechanism of replication of bacteriophage ϕ X174. XXII. Site-specific mutagenesis of the A' gene reveals that A' protein is not essential for ϕ X174 DNA replication. J.Mol.Biol. 197: 17-54.

Conrad,S.E., Wold,M. and Campbell,J.L. (1979). Origin and direction of DNA replication of plasmid RSF1030. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76: 736-740.

d'Aubenton-Carafa,Y., Brody,E. and Thermes,C. (1990). Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. J.Mol.Biol. 216: 835-858.

de la Campa,A., del Solar,G. and Espinosa,M. (1990). Initiation of replication of plasmid pLS1. The initiator protein RepB acts on two distant DNA regions. J.Mol.Biol. 213: 247-262.

Dempsey,L.A. and Dubnau,D.A. (1989). Localization of the replication origin of plasmid pE194. J.Bacteriol. 171: 2866-2869.

Díaz,R., Nordström,K. and Staudenbauer,W.L. (1981). Plasmid R1 DNA replication dependent on protein synthesis in cell-free extracts of *Escherichia coli*. Nature 289: 326-328.

Díaz,R. and Staudenbauer,W.L. (1982a). Replication of the broad host range plasmid RSF1010 in cell-free extracts of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Nucl.Acids Res. 10: 4687-4702.

Díaz,R. and Staudenbauer,W.L. (1982b). Origin and direction of mini-R1 plasmid DNA replication in cell extracts of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 150: 1077-1084.

Díaz,R. and Ortega,S. (1984). Initiation of plasmid R1 replication *in vitro* is dependent of transcription by host RNA polymerase. Nucl.Acids Res. 12: 5175-5191.

Dodd,I.B. and Egan,J.B. (1987). Systematic method for the detection of potential lambda Cro-like DNA-binding regions in proteins. J.Mol.Biol. 194: 557-564.

- Dodd,I.B. and Egan,J.B. (1990). Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucl.Acids Res.* 18: 5019-5026.
- Dong,X., Womble,D. and Rownd,R.H. (1987). Transcriptional pausing in a region important for plasmid NR1 replication control. *J.Bacteriol.* 169: 5353-5363.
- Espinosa,M., López,P., Pérez Ureña,M.T. and Lacks,S.A. (1982). Interspecific plasmid transfer between *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol.Gen.Genet.* 188: 195-201.
- Espinosa,M., López,P. and Lacks,S.A. (1984). Transfer and expression of recombinant plasmids carrying pneumococcal *mal* genes in *Bacillus subtilis*. *Gene* 28: 301-310.
- Feinberg,A.P. and Vogelstein,B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* 132: 6-13.
- Filutowicz,M., Uhlenhopp,E. and Helinski,D.R. (1985). Binding of purified wild-type and mutant Pi initiation proteins to a replication origin region of plasmid R6K. *J.Mol.Biol.* 187: 225-239.
- Friedman,D.I. and Olson,E.R. (1983). Evidence that a unique sequence, "boxA" is involved in the action of the *musA* protein. *Cell* 34: 143-149.
- Gennaro,M.L., Kornblum,J. and Novick,R.P. (1987). A site-specific recombination function in *Staphylococcus aureus* plasmids. *J.Bacteriol.* 169: 2601-2610.
- Giraldo,R. (1991). Estudios genéticos y bioquímicos sobre la participación de proteínas iniciadoras en la replicación del DNA de los plásmidos de bacterias gram-negativas R1 y pPS10. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Goze,A. and Ehrlich,S.D. (1980). Replication of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 77: 7333-7337.
- Gribskov,M., Burgess,R.R. and Devereux,J. (1986). PEPLOT, a protein secondary structure analysis program for the UWGCG sequence analysis software package. *Nucl.Acids Res.* 14: 327-334.
- Gruss,A.D., Ross,H.F. and Novick,R.P. (1987). Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84: 2165-2169.
- Haring,V., Scholz,P., Scherzinger,E., Frey,J., Derbyshire,K., Hatfull,G., Willetts,N.S. and Bagdasarian,M. (1985). Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 82: 6090-6094.
- Hillen,W., Schollmeier,K. and Gatz,C. (1984). Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance operon. II. Interaction of RNA polymerase and TET repressor with the *tet* operon regulatory region. *J.Mol.Biol.* 172: 185-201.
- Horinouchi,S. and Weisblum,B. (1982a). Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J.Bacteriol.* 150: 804-814.

- Horinouchi,S. and Weisblum,B. (1982b). Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J.Bacteriol.* 150: 815-825.
- Horiuchi,K. (1986). Interaction between gene II protein and the DNA replication origin of bacteriophage ϕ 1. *J.Mol.Biol.* 188: 215-223.
- Hurstel,S., Granger-Schnarr,M. and Schnarr,M. (1988). Contacts between the LexA repressor -or its DNA-binding domain- and the backbone of the *recA* operator DNA. *EMBO J.* 7: 269-275.
- Inouye,M. and Dudoock,B.S. Molecular biology of RNA: New perspectives. Academic Press. New York. 1987.
- Inuzuka,M. and Helinski,D.R. (1978). Requirement of a plasmid-encoded protein for replication *in vitro* of plasmid R6K. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75: 5381-5385.
- Iordanescu,S. (1976).-Three distinct plasmids originating in the same *Staphylococcus aureus* strain. *Arch.Roum.Pathol.Exp.Microbiol.* 35: 111-118.
- Iordanescu,S. and Projan,S.J. (1988). Replication termination for staphylococcal plasmids: plasmids pT181 and pC221 cross react in the termination process. *J.Bacteriol.* 170: 3427-3434.
- Itoh,T. and Tomizawa,J.I. (1980). Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 77: 2450-2454.
- Joenje,H., Admiraal,W. and Venema,G. (1973). Isolation and partial characterization of a temperature-sensitive mutant of *Bacillus subtilis* impaired in the development of competence for genetic transformation. *J.Gen.Microbiol.* 78: 67-77.
- Jordan,S.R. and Pabo,C.O. (1988). Structure of the lambda complex at 2.5 A resolution: details of the Repressor-operator interactions. *Science* 242: 893-899.
- Khan,S.A., Carleton,S.M. and Novick,R.P. (1981). Replication of plasmid pT181 DNA *in vitro*: requirement for a plasmid-encoded product. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 78: 4902-4906.
- Khan,S.A., Adler,G.K. and Novick,R.P. (1982). Functional origin of replication of pT181 plasmid DNA is contained within a 160-base-pair segment. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 79: 4580-4584.
- Khan,S.A. and Novick,R.P. (1983). Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 10: 251-259.
- Kim,K. and Meyer,R.J. (1986). Copy-number of broad host-range plasmid R1162 is regulated by a small RNA. *Nucl.Acids Res.* 14: 8027-8046.
- Koepsel,R.R., Murray,R.W., Rosenblum,W.D. and Khan,S.A. (1985a). The replication initiator protein of plasmid pT181 has sequence-specific endonuclease and topoisomerase-like activities. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82: 6845-6849.
- Koepsel,R.R., Murray,R.W., Rosenblum,W.D., and Khan,S.A. (1985b). Purification of pT181-encoded RepC protein required for the initiation of plasmid replication. *J.Biol.Chem.* 260: 8571-8577.

- Koepsel, R.R., Murray, R.W. and Khan, S.A. (1986). Sequence-specific interaction between the replication initiator protein of plasmid pT181 and its origin of replication. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83: 5484-5488.
- Kok, J., van der Vossen, J.M.B.M. and Venema, G. (1984). Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* 48: 726-731.
- Kolter, R. and Yanofsky, C. (1982). Attenuation in amino acid biosynthetic operons. *Annu.Rev.Genet.* 16: 113-134.
- Kornberg, A. (1980). DNA replication. Freeman and Co. S.Francisco.
- Kumar, C. and Novick, R.P. (1985). Plasmid pT181 replication is regulated by two countertranscripts. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82: 638-642.
- Kushner, S.R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. En: Genetic engineering, p17. (Eds.: Boyer, H.B. and Nicosia, S.). Elsevier/North-Holland. Amsterdam.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157: 105-132.
- Lacks, S.A. (1966). Integration-efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* 53: 207-235.
- Lacks, S.A., López, P., Greenberg, B. and Espinosa M. (1986). Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J.Mol.Biol.* 192: 753-765.
- Laskey, R.A. and Mills, A.D. (1975). Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur.J.Biochem.* 56: 335-341.
- Light, J. and Molin, S. (1982a). The sites of action of the two copy number control functions of plasmid R1. *Mol.Gen.Genet.* 187: 486-493.
- Light, J. and Molin, S. (1982b). Expression of a copy number control gene (*copB*) of plasmid R1 is constitutive and growth rate dependent. *J.Bacteriol.* 151: 1129-1135.
- Lilley, D.M. (1980). The inverted repeat as a recognizable structural feature in supercoiled DNA molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 77: 6468-6472.
- López, P., Martínez, S., Díaz, A., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1989). Characterization of the *polA* gene of *Streptococcus pneumoniae* and comparison of the DNA polymerase I it encodes to homologous enzymes from *Escherichia coli* and phage T7. *J.Biol.Chem.* 264: 4255-4263.
- Ludlow, J.W., Yuen, K.C.L. and Consigli, R.A. (1985). Fluorographic detection of ^3H thymidine-labeled deoxyribonucleic acid using agarose gels infused with 2,5-diphenyloxazole prior to electrophoresis. *Anal.Biochem.* 145: 212-215.
- Luria, S.E. and Berrows, J.W. (1957). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J.Bacteriol.* 74: 461-476.
- Majumder, S. and Novick, R.P. (1988). Intermediates in plasmid pT181 DNA replication. *Nucl.Acids Res.* 16: 2897-2912.

Manch-Citron,J., Gennaro,M.L., Majumder,S. and Novick,R.P. (1986). RepC is rate-limiting for pT181 plasmid replication. *Plasmid* 16: 108-115.

Maniatis,T., Fritsch,E.F. and Sambrook,J. (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. NY.

Mannarelli,B.M., Balganesch,T.S., Greenberg,B., Springhorn,S.S. and Lacks,S.A. (1985). Nucleotide sequence of the *DpnII* DNA methylase gene of *Streptococcus pneumoniae* and its relationship to the *dam* gene of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82: 4468-4472.

Masai,H., Kaziro,Y. and Arai,K. (1983). Definition of *oriR*, the minimum DNA segment essential for initiation of R1 plasmid replication *in vitro*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80: 6814-6818.

Masai,H. and Arai,K. (1987). RepA and DnaA proteins are required for initiation of R1 plasmid replication *in vitro* and interact with the *oriR* sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84: 4781-4785.

Masai,H. and Arai,K. (1989). Leading strand synthesis of R1 plasmid replication *in vitro* is primed by primase alone at a specific site downstream of *oriR*. *J.Biol.Chem.* 264: 8082-8090.

Maxam,A.H. and Gilbert,W. (1980). Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65: 499-560.

Mckenzie,T., Hoshino,T., Tanaka,T. and Sueoka,N. (1986). The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* 15: 93-103.

Meacock,P.A. and Cohen,S.N. (1980). Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a *cis*-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell* 20: 529-542.

Michel,B. and Ehrlich,S.D. (1986a). Illegitimate recombination at the replication origin of the plasmid pC194. *EMBO J.* 5: 3691-3696.

Michel,B. and Ehrlich,S.D. (1986b). Illegitimate recombination at the replication origin of bacteriophage M13. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83: 3386-3390.

Miller,J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory. NY.

Minton,N.P. (1984). Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lac* gene fusions. *Gene* 31: 269-273.

Minton,N.P., Oultram,J.D., Brehm,J.K. and Atkinson,T. (1988). The replication proteins of plasmids pE194 and pLS1 have N-terminal homology. *Nucl.Acids Res.* 16: 3101.

Moran,C.P.Jr., Lang,N., LeGrice,S.F.J., Lee,G., Stephens,M., Sonenshein,A.L., Pero,J. and Losick,R. (1982). Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol.Gen.Genet.* 186: 339-346.

Nielsen,P.F. and Molin,S. (1984). How the R1 replication control system responds to copy number deviations. *Plasmid* 11: 264-267.

- Noirot,P., Bargonetti,J. and Novick,R.P. (1990). Initiation of rolling-circle replication in pT181 plasmid: initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87: 8560-8564.
- Nordström,K., Molin,S. and Aagaard-Hansen,H. (1980a). Partitioning of plasmid R1 in *Escherichia coli*: I. Kinetics of loss of plasmid derivatives deleted of the *par* region. *Plasmid* 4: 215-227.
- Nordström,K., Molin,S. and Aagaard-Hansen,H. (1980b). Partitioning of plasmid R1 in *Escherichia coli*: II. Incompatibility properties of the partitioning system. *Plasmid* 4: 332-349.
- Nordström,K., Molin,S. and Light,J. (1984). Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid* 12: 71-90
- Nordström,M. and Nordström,K. (1985). Control of replication of FII plasmids: comparison of the basic replicons and of the *copB* systems of plasmids R100 and R1. *Plasmid* 13: 81-87.
- Nordström,K. and Austin,S.J. (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu.Rev.Genet.* 23: 37-69.
- Novick,R.P., Iordanescu,S., Surdeanu,M. and Edelman,I. (1981). Transduction-related cointegrate formation between staphylococcal plasmids: a new type of site-specific recombination. *Plasmid* 6: 159-172.
- Novick,R.P., Projan,S.J., Rosenblum,W. and Edelman,I. (1984). Staphylococcal plasmid cointegrates are formed by host- and phage-mediated general *rec* systems that act on short regions of homology. *Mol.Gen.Genet.* 195: 374-377.
- Novick,R.P., Projan,S.J., Kumar,C.C., Carleton,S., Gruss,A., Highlander,S.K. and Kornblum,J. (1985). Replication control for pT181, an indirectly regulated plasmid. En: *Plasmids in bacteria*, pp. 299-320 (Eds.: Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. and Hollaender,A.). Plenum Publ. Co., New York.
- Novick,R.P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol.Rev.* 51: 381-395.
- Novick,R.P., Iordanescu,S., Projan,S.J., Kornblum,J. and Edelman,I. (1989). pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell* 59: 395-404.
- Novick,R.P. (1989). Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu.Rev.Microbiol.* 43: 537-565.
- Ohlendorf,D.H., Anderson,W.F. and Matthews,B.W. (1983). Many gene-regulatory proteins appear to have a similar α -helical fold that binds DNA and evolved from a common precursor. *J.Mol.Evol.* 19: 109-114.
- Ohman,M. and Wagner,E.G.H. (1989). Secondary structure analysis of the RepA mRNA leader transcript involved in control of replication of plasmid R1. *Nucl.Acids Res.* 17: 2557-2579.
- Otwinowski,Z., Schevitz,R.W., Zhang,R.-G., Lawson,C.L., Joachimiak,A., Marmorstein,E.Q., Luisi,B.F. and Sigler,P.B. (1988). Crystal structure of the *trp* repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature* 335: 321-329.

Pabo, C.O. and Sauer, R.T. (1984). Protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 293-321.

Pérez-Martín, J., del Solar, G., de la Campa, A.G. and Espinosa, M. (1988). Three regions in the DNA of plasmid pLS1 show sequence-directed static bending. *Nucl. Acids Res.* 16: 9113-9126.

Pérez-Martín, J., del Solar, G., Lurz, R., de la Campa, A.G., Dobrinski, B. and Espinosa, M. (1989). Induced bending of plasmid pLS1 DNA by the plasmid-encoded protein RepA. *J. Biol. Chem.* 264: 21334-21339.

Pérez-Martín, J. and Espinosa, M. (1991). The RepA repressor can act as a transcriptional activator by DNA-induced bends. *EMBO J.* 10: 1375-1382.

Piggot, P.J. and Hoch, J.A. (1985). Revised genetic linkage map of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 49: 158-179.

Priebe, S.D. and Lacks, S.A. (1989). Region of the streptococcal plasmid pMV158 required for conjugative mobilization. *J. Bacteriol.* 171: 4778-4784.

Pritchard, R.H. (1974). On the growth and form of a bacterial cell. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* 267: 303-336.

Projan, S.J., Carleton, S. and Novick, R.P. (1983). Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* 9: 182-190.

Projan, S.J., Kornblum, J., Moghazeh, S.L., Edelman, I., Gennaro, M.L. and Novick, R.P. (1985). Comparative sequence and functional analysis of pT181 and pC221, cognate plasmid replicons from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 199: 452-464.

Projan, S.J. and Novick, R.P. (1986). Incompatibility between plasmids with independent copy control. *Mol. Gen. Genet.* 204: 341-348.

Projan, S.J. and Novick, R.P. (1988). Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. *Plasmid* 19: 203-221.

Ptashne, M. A genetic switch. Cell Press & Blackwell. Cambridge, 1986.

Reeve, J.N., Mendelson, N.H., Coyne, S.I., Hallok, L.L. and Cole, R.M. (1973). Minicells of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 114: 860-873.

Rhodes, D. and Klug, A. (1980). Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion. *Nature* 286: 573-578.

Riise, E., Stougaard, P., Bindslev, B., Nordström, K. and Molin, S. (1982). Molecular cloning and functional characterization of a copy number control gene (*copB*) of plasmid R1. *J. Bacteriol.* 151: 1136-1145.

Riise, E. and Molin, S. (1986). Purification and characterization of the CopB replication control protein and precise mapping of its target site in the R1 plasmid. *Plasmid* 15: 163-171.

Rogers, E.J., Ambulos, N.P. Jr. and Lovett, P.S. (1990). Complementarity of *Bacillus subtilis* 16S rRNA with sites of antibiotic-dependent ribosome stalling in *cat* and *erm* leaders. *J. Bacteriol.* 172: 6282-6290.

- Rosenberg, M. and Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13: 319-353.
- Sakakibara, Y. and Tomizawa, J.I. (1974). Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 802-806.
- Salas, M. (1988). Un nuevo mecanismo de iniciación de la replicación del DNA mediante proteína terminal. Discurso de recepción. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Madrid.
- Saunders, C.W. and Guild, W.R. (1980). Properties and transforming activities of two plasmids in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 180: 573-578.
- Scheer-Abramowitz, J., Gryczan, T.J. and Dubnau, D. (1981). Origin and mode of replication of plasmids pE194 and pUB110. *Plasmid* 6: 67-77.
- Shafferman, A., Kolter, R., Stalker, D. and Helinski, D.R. (1982). Plasmid R6K DNA replication. III. Regulatory properties of the Pi initiation protein. *J. Mol. Biol.* 161: 57-76.
- Smith, M.D., Shoemaker, N.B., Burdett, V. and Guild, W.R. (1980). Transfer of plasmids by conjugation in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* 3: 70-79.
- Sollner-Webb, B. and Reeder, R.H. (1979). The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in *Xenopus laevis*. *Cell* 18: 485-499.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sozhamannan, S., Dabert, P., Moretto, V., Ehrlich, S.D. and Gruss, A. (1990). Plus-origin mapping of single-stranded DNA plasmid pE194 and nick site homologies with other plasmids. *J. Bacteriol.* 172: 4543-4548.
- Staacke, D., Walter, B., Kisters-Woike, B., Wilcken-Bergmann, B. and Müller-Hill, B. (1990). How Trp repressor binds to its operator. *EMBO J.* 9: 1963-1967.
- Stalker, D.M., Thomas, C.M. and Helinski, D.R. (1981). Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* 181: 8-12.
- Stassi, D.L., López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1981). Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7028-7032.
- Staudenbauer, W.L. (1976). Replication of small plasmids in extracts of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 145: 273-280.
- Staudenbauer, W.L. (1984). Plasmid DNA replication *in vitro*. En: *Advanced Molecular Genetics*, pp. 325-337. (Eds. Puhler, A. and Timmis, K.N.). Springer-Verlag Berlin, New York.
- Stoker, N.G., Fairweather, N.F. and Spratt, B.G. (1982). Versatile low-copy plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* 18: 335-341.
- Stougaard, P., Molin, S. and Nordström, K. (1981). RNAs involved in copy number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6008-6012.

Studier,F.W. and Moffatt,B.A. (1986). Selective expression of cloned genes directed by T7 RNA polymerase. *J.Mol.Biol.* 189: 113-130.

Studier,F.W., Rosenberg,A.H. and Dunn,J.J. (1989). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzimol.* 185: 60-89.

Tabor,S. and Richardson,C.C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82: 1074-1078.

te Riele,H., Michel,B. and Ehrlich,S.D. (1986a). Are single-stranded circles intermediates in plasmid DNA replication?. *EMBO J.* 5: 631-637.

te Riele,H., Michel,B. and Ehrlich,S.D. (1986b). Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 83: 2541-2545.

Thomas,C.M. (1988). Recent studies on the control of plasmid replication. *Biochim.Biophys.Acta* 949: 253-263.

Tomizawa,J.I. and Itoh,T. (1981). Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78: 6096-6100.

Tomizawa,J.I., Itoh,T., Selzer,G. and San,T. (1981). Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78: 1421-1425.

Tucker,W.T., Miller,C.A. and Cohen,S.N. (1984). Structural and functional analysis of the *par* region of the pSC101 plasmid. *Cell* 38: 191-201.

Tullius,T.D. and Dombroski,B.A. (1986). Hydroxyl radical "footprinting": high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 83: 5469-5473.

van der Lelie,D., Bron,S., Venema,G. and Oskam,L. (1989). Similarity of minus origins of replication and flanking open reading frames of plasmid pUB110, pTB913 and pMV158. *Nucl.Acids Res.* 17: 7283-7294.

van der Lelie,D., Wösten,H.A.B., Bron,S., Oskam,L. and Venema,G. (1990). Conjugal mobilization of streptococcal plasmid pMV158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J.Bacteriol.* 172: 47-52.

van Wezenbeek,P.M.G.F., Hulsebos,T.J.M. and Schoenmakers,J.G.G. (1980). Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. *Gene* 11: 129-148.

Villafane,R., Bechhofer,D.H., Narayan,C.S. and Dubnau,D.A. (1987). Replication control genes of plasmid pE194. *J.Bacteriol.* 169: 4822-4829.

Wagner,E.G.H. and Nordström,K. (1986). Structural analysis of a molecule involved in replication control of plasmid R1. *Nucl.Acids Res.* 14: 2523-2538.

Wagner,E.G.H., von Heijne,J. and Nordström,K. (1987). Control of replication of plasmid R1: Translation of the 7k reading frame in the RepA mRNA leader region counteracts the interaction between CopA-RNA and CopT-RNA. *EMBO J.* 6: 515-522.

Wahle,E. and Kornberg,A. (1988). The partition locus of plasmid pSC101 is a specific binding site for DNA gyrase. *EMBO J.* 7: 1889-1895.

Womble,D.D., Dong,X., Wu,R.P., Luckow,V.A., Martínez,A.F. and Rownd,R.H. (1984). IncFII plasmid incompatibility product and its target are both RNA-transcripts. J.Bacteriol. 160: 28-35.

Wu,H.-Y., Shyy,S., Wang,J.C. and Liu,L.F. (1988). Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. Cell 53: 433-440.

Young,F.E. and Wilson,G.A. (1972). Genetics of *Bacillus subtilis* and others gram-positive sporulating bacilli. En: Spores V, pp. 77-106 (Eds. Halvorson,H.O., Hanson,R. and Campbell,L.L.). Amer.Soc.Microbiol. Washington.